

Vergleichende Analyse von Rinder und Mäuse Nervenwachstums-
faktor mit molekularbiologischen und immunologischen Methoden

Roland Meier

Vergleichende Analyse von Rinder und Mäuse Nervenwachstums-
faktor mit molekularbiologischen und immunologischen Methoden

Dissertation der Fakultät für Biologie der Ludwig-
Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Roland Meier

München, November 1985

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Kaudewitz
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolf
- Sondergutachter: Prof. Dr. Thoenen

Tag der mündlichen Prüfung: 10.3. 1986

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Thoenen und Herrn Dr. Heumann in der Abteilung Neurochemie des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie in Martinsried durchgeführt.

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL und METHODEN	7
1. Stämme von E.coli K12	7
2. Chemikalien	7
3. Abkürzungen	9
4. Medien und Puffer	11
5. Proteinbestimmung	16
6. Kultivierung von PC12 Zellen	17
7. Kovalente Kopplung von Protein und Peptiden an Trägerprotein.	17
8. Thiocyanylierung von β -NGF	19
9. Immunisierung von Kaninchen und Gewinnung der Antisera.	20
10. Enzymimmuntest	21
11. Präparation eines 100.000 g Proteinhomogenates der submaxillaren Speicheldrüse.	22
12. Jodierung	22
13. Jodierung von Protein im Polyacrylamidgel und zweidimensionale Peptidkartierung.	23
14. Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	25
15. Immunblotten	26
16. <u>In vitro</u> Translation von mRNA in einem Kaninchen-Retikulozytenlysat.	29
16.1. Präparation eines Lysates	29
16.2. Behandlung des Lysates mit Mikrokokkus Nukle- ase	29
16.3. Abschätzung der Syntheseleistung	30
16.4. Optimierte <u>in vitro</u> Translationsbedingungen	31
16.5. Immunologische Analyse <u>in vitro</u> syntheti- sierter Proteine.	32
16.6. <u>In vitro</u> Translation hybridselektierter mRNA	33

17. Isolierung von cytoplasmatischer RNA und von poly(A) ⁺ RNA.	36
18. Alkalische Extraktionsmethode für die Isolierung von Vektor-DNA	38
19. Präparation von genom. DNA von Rind und Maus	41
20. Radioaktive Markierung von DNA Proben durch "nick translation"	42
21. Reinigung von Oligodesoxyribonukleotiden und 5'Endmarkierung	43
22. Einzelsträngige, ³² P-markierte RNA-Hybridisierungsprobe.	45
23. Restriktionsverdau, Elektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen	45
24. Transfer von DNA aus Agarosegelen auf Nitrozellulosefilter und Hybridisierung mit radioaktiven NGF-spezifischen Proben.	46
25. Transfer von glyoxylierter RNA auf Nitrozellulose und Hybridisierung mit einer einzelsträngigen ³² P-markierten RNA-Probe	49
26. Dot-Blot Tests für RNA und DNA	49
27. Synthese doppelsträngiger cDNA	50
28. Behandlung der cDNA mit S1-Nuklease und Größenfraktionierung über Sepharose CL4B.	52
29. Addition von dCs an doppelsträngige cDNA	54
30. Insertion der cDNA in pBR 322 durch nicht kovalente Verknüpfung über dG/dC-Basenpaarung	55
31. Transformationsprotokolle für E.coli mit Plasmid-DNA	55
32. Koloniehybridisierung	58
33. Dephosphorylierung von 5'Enden	60
34. 3'Endmarkierung von Restriktionsfragmenten mit α - ³² P Cordycepin.	60
35. Chemisches Sequenzieren nach Maxam und Gilbert	61
36. Präparation doppelsträngiger M13 Phagen DNA	63
37. Präparation von M13 ssDNA nach Yough	63
38. Ligation kohäsiver Enden	64
39. Infektion von Bakterienzellen mit M13 Phagen	65
40. M13 Didesoxy-Sequenzierung	66

41. Standard-Sequenzgele	69
42. Puffergradienten-Sequenzgele	70
III. ERGEBNISSE	72
Überblick der experimentellen Befunde, die für die Existenz eines Vorläufers von NGF sprechen	72
1. Immunologischer Nachweis von Vorläufer-Proteinen des NGFs der Maus.	74
1.1. Darstellung des allgemeinen Konzepts	74
1.2. Gewinnung von Antikörpern, die das Monomer der β -Untereinheit von NGF erkennen.	76
1.2.1. Suche nach geeigneten Applikationsformen für NGF, die die Quartärstruktur des Immunogens weitgehend ausschließen.	76
1.2.2. Prüfung der Antiseren auf immunologische Kreuzreaktion mit dem NGF-Monomer.	79
1.3. Die produzierten Antiseren kreuzreagieren im Speicheldrüsenhomogenat der Maus mit Proteinen, die deutlich größer sind als 13kD.	79
1.4. Verbesserte Auftrennung der Proteine des Homogenats im 2D-Immunblot.	87
1.5. Überprüfung der immunologischen Daten mittels der Fingerprint-Analyse.	93
1.6. Zusammenfassung	97
2. Immunologische Analyse <u>in vitro</u> translatierter Proteine der männlichen Speicheldrüse	98
2.1. <u>In vitro</u> Translation von poly(A) ⁺ mRNA der männlichen Speicheldrüse	99
2.1.1. Isolation intakter poly(A) ⁺ mRNA mittels der Guanidiniumthiocyanat-Methode	100

2.1.2. Optimierung der <u>in vitro</u> Translation	102
2.1.2.1. Optimierung des Ionenmilieus	104
2.1.2.2. Korrelation zwischen radioaktivem Einbau und angebotener Menge an mRNA	108
2.2. Antikörper gegen denaturierten NGF binden spezifisch im Translationsansatz ein Protein von 34 kD.	113
3. Ermittlung des primären Translationsprodukts von NGF durch Verwendung eines cDNA-Klons	116
3.1. <u>In vitro</u> Translation hybridselektierter mRNA von prä-pro-NGF	119
3.2. Vergleich der immunologisch nachgewiesenen Vorläufer mit den Prozessierungssignalen der cDNA ^{NGF} .	121
4. Gewinnung von Antikörpern, die gegen ein Peptid der pro-Sequenz von Maus NGF gerichtet sind.	123
4.1. Voraussagen antigener Determinanten des Vorläufers aus der Aminosäuresequenz	124
4.2. Immunisierung von Kaninchen mit einem Peptid der pro-NGF-Sequenz	127
4.3. Prüfung der Antiseren auf Kreuzreaktion mit dem nativen Protein	131
5. Klonierung des Nervenwachstumsfaktors des Rindes	132
5.1. Identifizierung NGF-spezifischer Sequenzen im Genom des Rindes	134
5.2. Nachweis von NGF-Transkripten in der bovinen Glandula vesiculosa	137
5.3. Erstellung einer cDNA-Bank aus der Glandula vesiculosa	141
5.3.1. Synthese doppelsträngiger cDNA, S1-Nuklease und terminale Transferase-Behandlung	143
5.3.2. Optimierung der Transformationseffizienz von E.coli K12	151

5.3.3. Erstellung der cDNA-Bank, Kolonienhybridisierung mit einem 18mer Oligonukleotid und einem Restriktionsfragment	156
5.3.4. Restriktionskartierung mehrerer cDNA-Klone	160
6. Chemische und Didesoxy-Sequenzierung	162
6.1. Umklonierung von Restriktionsfragmenten in M13 mp-Vektoren	163
6.2. Chemische und enzymatische Sequenzierung von Rinder-NGF	165
6.3. Vergleich der NGF-Sequenzen von Maus, Mensch und Rind	171
IV. DISKUSSION UND AUSBLICK	178
V. ZUSAMMENFASSUNG	192
VI. ANHANG	195
VII. LITERATURVERZEICHNIS	207

I. EINLEITUNG

Das Nervensystem der Tiere, insbesondere der Vertebraten, stellt sicher die komplexeste Struktur dar, die die Evolution hervorgebracht hat. Werden wir jemals die Zusammenhänge erkennen, die zur Höherentwicklung des Nervensystems im Laufe der Evolution - nach unserem heutigen Verständnis allein getrieben durch Mutation und Selektion - geführt haben? Genauso unvorstellbar und unverstanden sind all die Ereignisse, die während der Ontogenese eines Individuums ablaufen müssen, damit dieser hohe Grad an morphologischer und funktioneller Ordnung in reproduzierbarer Weise erreicht werden kann. Wir wissen von der Fehlerkorrektur bei der DNA-Replikation, aber wir wissen so gut wie nichts über den Mechanismus der richtigen Verdrahtung von Neuronen, noch ob es zu Fehlschaltungen kommt, und wie diese möglicherweise rückgängig gemacht werden können. So gibt uns in dieser Hinsicht schon der monosynaptische Reflexbogen, ganz geschweige vom polysynaptischen, eine Fülle von Rätseln auf. Rätsel und ihre Lösungen, die in circa 30.000 menschlichen Genen vererbt sein wollen. In diesem Jahrhundert ist es der Neurobiologie gelungen, die Tür zu einigen dieser Rätseln einen Spalt weit aufzustoßen.

So ist beispielsweise der Tod junger Nervenzellen ein normaler Bestandteil der embryonalen Entwicklung des vertebralen Nervensystems. Eine anfängliche starke Zellvermehrung läßt einen Überschuß an Nervenzellen entstehen und der nachfolgende Zelltod, so vermutet man, paßt die Neuronenzahl an die Größe des Innervationsfeldes an (Jacobson, 1978). Die experimentelle Manipulation dieses Feldes, wie beispielsweise die Implantation einer Beinknospe (Harrison, 1910), kann die Zahl der überlebenden Neurone erheblich beeinflussen. Für das Einwachsen von Nervenfasern in peripheres Gewebe ist nicht dessen Struktur ausschließlich maßgebend, wie Levi Montalcini und Hamburger überzeugend durch die Innervation

eines Mäuse-Sarkoms (Nr. 180 und 37) in Hühnerembryonen demonstrierten, sondern offensichtlich spielt auch die Sekretion von Gewebshormonen in das Zielgewebe eine entscheidende Rolle (Levi Montalcini 1952). Die neurobiologische Disziplin spricht heute von neurotrophen Faktoren, die das Überleben von Neuronen und deren Differenzierung ermöglichen. Die berühmten Experimente mit dem Mäuse-Sarkom haben zur Isolierung und Charakterisierung des Nervenwachstumsfaktors der Maus (mNGF) als bisher dem einzigen neurotrophen Faktor mit einer allgemeinen anerkannten physiologischen Bedeutung geführt (Cohen, 1960). Mit Sicherheit ist NGF nur einer aus einem ganzen Spektrum von neurotrophen Faktoren, dessen Isolierung dem glücklichen Umstand zu verdanken ist, daß er aus neurobiologischer Sicht völlig unerklärlich in großen Mengen in der Speicheldrüse der männlichen Maus vorkommt. Im peripheren Nervensystem ist die Wirkung des NGFs auf sympathische und sensorische Neurone beschränkt, der trophische Effekt des Innervationsfeldes ist aber sicher nicht auf diese beiden Neuronentypen beschränkt, sondern ein allgemeines Prinzip, das sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem anzutreffen ist (Barde, Edgar, Thoenen, 1983). Die Charakterisierung und Isolierung neuer neurotropher Faktoren, die möglicherweise wie NGF als retrogrades Messenger-Molekül wirken (Korsching, und Thoenen, 1983), ist bisher noch sehr zeitraubend, da man mit enorm großen Reinigungsfaktoren (ca. 10^6) zu rechnen hat (Barde, et al. 1982) und strenge Kriterien bei der Überprüfung der biologischen Aktivität anlegen muß, um indirekte Effekte im biologischen Test auszuschließen.

In den letzten Jahren konnten einige typische, mitotische Wachstumsfaktoren wie z.B. EGF (Scott et al. 1983) und PDGF (Dalla Favera et al. 1981; 1982) kloniert und sequenziert werden und in einigen Fällen konnte sogar ein Zusammenhang zur Krebsentstehung hergestellt werden (Doolittle, R.F. 1983). NGF hingegen ist kein Mitogen und seine Bezeichnung "Nervenwachstumsfaktor" ist gerade im Kontext mit anderen, mitotisch wirksamen Wachstumsfaktoren irreführend. Er gehört

ausschließlich der Gruppe neurotropher Faktoren an, die das Überleben nicht mehr teilungsfähiger neuronaler Vorläuferzellen in vivo und in vitro ermöglichen und für deren Ausdifferenzierung sorgen. Bisher gibt es keine Evidenzen für seine direkte oder indirekte Beteiligung an Tumoren des Nervensystems.

Vorkommen und Biochemie von NGF

Exokrine Drüsen oder ihre Sekretionsprodukte sind zur Reinigung von NGF herangezogen worden, wie beispielsweise Gifte bestimmter Schlangenfamilien (Levi-Montalcini und Cohen 1956; Cohen 1959) und die Prostata von Meerschweinchen und Wiederkäuern (Harper et al. 1979; 1982). Mit Abstand kommt am meisten NGF in der Speicheldrüse der männlichen Maus vor; üblicherweise wird er hieraus auch präpariert (Cohen 1960). Er kommt dort in einem multimeren Proteinkomplex vor, der wegen seiner Sedimentationskonstante als 7S NGF in die Literatur Eingang gefunden hat (Varon, et al. 1967). Der durch 1-2 Zinkatome stabilisierte Komplex weist die Stöchiometrie $\alpha_2 \gamma_2 \beta$ auf (Varon, et al. 1968; Bothwell et al. 1978). Die α - und die β -Untereinheit sind Mitglieder der Kallikreinfamilie der Säuger Serinproteasen (Ronne et al. 1984; Mason, 1983), wobei die γ -Untereinheit eine aktive Arginylesterpeptidase darstellt, deren Enzymaktivität jedoch nahezu vollständig im 7S Komplex durch die β -Untereinheit kompetitiv gehemmt wird (Bothwell et al. 1978). Diese Hemmung läßt sich auf die carboxyterminalen Arginine der dimeren β -Untereinheit zurückführen, denn ihre Abspaltung verhindert die Bildung des 7S NGFs (Moore et al. 1974). Die α - und die γ -Untereinheit weisen mikroheterogene Formen auf, die durch posttranslationale Modifikationen, wie z.B. begrenzte Proteolyse, bedingt sind und physiologische Konsequenzen bei der Ligandenbindung nach sich ziehen dürften (Nichols et al. 1983; siehe Review von Calissano et al. 1984 S.4). Die α -Untereinheit hat keine proteolytische

Aktivität; sie ist an der Stabilisierung des Maus 7S Komplexes beteiligt, aber ihre sonstige Rolle ist unverständlich (Varon et al. 1968; Greene et al. 1968). Für die Aktivierung von Serinproteasen ist grundsätzlich die Abspaltung eines zymogenen Peptids am Aminotermius der Protease notwendig (Bode 1983). Diese Prozessierung ist in der α -Untereinheit durch den Verlust des entsprechenden Arginins nicht mehr möglich, was den Mangel an Enzymaktivität bereits hinreichend erklären kann (Ronne et al. 1983).

Die β -Untereinheit, im folgenden als β -NGF bezeichnet, ist ausschließlich für die neurobiologischen Effekte verantwortlich (Bocchini und Angeletti 1969). Sie ist ein dimeres Molekül von zwei identischen, nicht kovalent verknüpften Ketten mit jeweils 118 Aminosäuren und insgesamt sechs Disulfidbrücken. Die Aminosäuresequenz von β -NGF der Maus wurde vollständig (Hogue-Angeletti et al. 1971; 1973), von Kobra, Meerschweinchen und Rind nur teilweise erstellt (Hogue-Angeletti 1976; Rubin et al. 1981; Harper et al. 1982). Wird β -NGF nicht aus dem zuvor isolierten 7S Komplex, sondern direkt als sogenannter 2.5S NGF präpariert (Bocchini, Angeletti 1969) so tritt während der Aufarbeitung teilweise Proteolyse auf; am Aminotermius wird ein Octapeptid, am Carboxyterminus das endständige Arginin abgespalten. Diese Modifikationen lassen sich auf die β NGF-Endopeptidase (Wilson 1979) und eine Carboxypeptidase der Mausspeicheldrüse zurückführen; beide haben aber keinen Einfluß auf die biologische Aktivität des Moleküls. Der in der Speicheldrüse der Maus synthetisierte NGF kommt wie bereits angesprochen als 7S Komplex vor, der in seiner nicht dissoziierten Form weder an NGF Rezeptoren von Neuronen bindet (Harris-Warrick et al. 1978) noch im Ganglion-Bioassay biologische Aktivität zeigt (Stach et al. 1979). Die Anwesenheit sowohl einer argininspezifischen, hemmbaren Esteropeptidase als auch der NGF Untereinheit mit endständigem Arginin in diesem Komplex hat zu der Vermutung geführt, daß die NGF Polypeptidkette aus einem Vorläuferprotein hervorgeht (Angeletti, Bradshaw 1971).

Physiologische Relevanz und Vorstellung zum Wirkungsmechanismus von NGF

Vier grundlegende Beobachtungen haben dazu geführt, NGF als retrograden, neurotrophen Faktor einzustufen:

- Der Entzug von endogenem NGF im Versuchstier durch ein spezifisches Antiserum gegen Maus-NGF (Immunsympathektomie), durch irreversible Zerstörung der Nervenendigung beispielsweise durch 6-Hydroxydopamin (Levi-Montalcini et al. 1975), also durch chemische Sympathektomie und durch chirurgische Axotomie führt entweder zur Zerstörung des gesamten sympathischen Nervensystems oder der betroffenen Neurone bei neugeborenen Säugern. Bei pränatalem Eingriff läßt sich auch eine partielle Degeneration von sensorischen Neuronen erreichen (vergleiche Harper, Thoenen, 1981; Calissano, et al. 1984)
- Applikation von NGF führt zu einer Hypertrophie sensorischer und sympathischer Ganglien und zur Induktion von Transmitter synthetisierender Enzyme (vergl. Thoenen, Barde 1980).
- Sympathische und eine Gruppe von sensorischen Neuronen besitzen Rezeptoren für NGF. Exogener, ^{125}J markierter NGF wird internalisiert und retrograd zum Perikaryon transportiert.
- Nachweis des retrograden Transports von endogenem NGF (Korsching et al. 1983).

Diese und weitere Befunde führten zum Modell, daß NGF in den Zielorganen des sympathischen und sensorischen Nervensystems synthetisiert wird, von den innervierenden Neuronen aufgenommen, zum Zellkörper retrograd transportiert wird und seine Wirkungen wie Enzyminduktionen, beschleunigte Differenzierung sympathischer Neuroblasten und chemotaktischer Einfluß auf das Auswachsen der Nervenfasern etc. ausübt (vergl. Harper G.P.; Thoenen, H. 1981). Dabei soll der Wirkungsmechanismus von NGF über einen second messenger erfolgen, wobei die Interaktion des NGF mit dem (den)

Rezeptor(en) der Zelloberfläche ein "conditio sine qua non" für seine biologische Aktivität darstellt (Heumann et al. 1981).

Bis vor kurzem gab es für diese Hypothese nur indirekte Evidenzen (Schwab, M., Thoenen, H. 1983), denn es bestand nicht die Möglichkeit, NGF, wegen seiner äußerst geringen Konzentration, weder im peripheren Innervationsfeld noch in den korrespondierenden sympathischen Neuronen verlässlich zu messen. Die Entwicklung eines sensitiven, zweiseitigen Enzymimmuntests erlaubte es jetzt, dieses Modell zu einem gesicherten Faktum zu machen und die Dichte der sympathischen Innervation in Abhängigkeit des NGF Gehaltes im Zielgewebe nachzuweisen (Korsching, S., Thoenen, H. 1983a und 1983b).

Ziel der Arbeit

Die Einführung molekularbiologischer Techniken in die Neurobiologie sollen es ermöglichen, neue Wege in dieser Disziplin zu beschreiten. Vor allem erhofft man sich, auf dem Gebiet der neurotrophen Faktoren durch Klonierung und DNA-Sequenzierung rascher ein molekulares Verständnis für diese Proteine zu erlangen. Obwohl bereits Ende der 40iger Jahre erstmals die neurotrophe Wirkung von NGF beobachtet werden konnte, war 1982 die Vorstufe von NGF immer noch nicht nachgewiesen. Auch gibt es bisher auf molekularer Ebene keine Erklärung für die Evolution dieses Proteins: alle bisher untersuchten NGFs sind bezüglich ihres biologischen Effekts auf kultivierte Hühnchen-Ganglien (Levi Montalcini et al. 1954) untereinander austauschbar und vermutlich bei allen Vertretern der Vertebraten (bei den Teleostei nachgewiesen siehe Hill et al 1975) biologisch aktiv; die immunologischen Eigenschaften dieses Proteins unterlagen jedoch ganz im Gegensatz dazu einer starken Divergenz, so daß bereits deutliche Unterschiede innerhalb der Mammalia feststellbar sind (Harper, G.P. et al 1983).

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Stämme von E. coli K 12

Hb 101	F ⁻ , hsd S20 (r _B ⁻ m _B ⁻) recA 13, ara-14, pro A2, lac Y1, gal K2, rps L 20, xyl-5, mtl-1, sup E44, λ ⁻ ;	Boyer et al. 1969
C 600	F ⁻ ; sup E44, thi-1, thr-1, leu B6, lac Y 1, ton A21, λ ⁻	Appleyard 1954
RR 1	F ⁻ , hsd S20 (r _B ⁻ , m _B ⁻), sup E44, ara-14, rps L 20 (sm ^r); gal K2; lac Y1; pro A2, xyl-5, mtl-1;	Bolivar et al. 1977
JM 101	supE, thi, Δ(lac , pro AB); [F', tra D36, pro AB, lacI ^a Z ΔM 15];	Messing et al. 1981
JM 103	sup E, thi, Δ(lac ,pro AB); end A, sbc B15, [F', tra D36, pro AB ⁺ , lacI ^a , Z ΔM 15].	Messing et al. 1981
JM 83	ara, Δ(lac , pro AB), rps L (= strA), [φ 80 lac Z ΔM 15]	Vierra et al. 1982

2. Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien von der Firma Merck bezogen.

Acrylamid

Bio Rad/ Richmond

Agar	Difco/ Detroit
Agarose	BRL/ Gaithersburg
Ampicillin	Serva/ Heidelberg
Baktotrypton	Difco/ Detroit
BSA (Pentax Fraktion V)	Sigma/ St. Louis
	Miles/ Elkhart USA
Cycloheximid	Serva/ Heidelberg
Hydrazin	NEN/ Boston
DEP	Sigma/ St. Louis
Dimethylsulfat	NEN/ Boston
DNA	Sigma/St. Louis
DNase	Boehringer/ Mannheim
DNA-Polymerase (Klenow)	Boehringer/
EDTA	Sigma/ St. Louis
Enzyme	Boehringer/ Mannheim
	NEN/ Boston
	New England Biolabs/ Beverley
	BRL/ Gaithersburg
Ethidiumbromid	Sigma/ St. Louis
Glutaraldehyd 25%	Serva/ Heidelberg
Guanidiniumthiocyanat	Fluka/ Schweiz
Leupeptin	Sigma/ St. Louis
N,N,N,N-Tetraäthylen=	Bio Rad/ Richmond
diamin	
Nitrozellulose	Schleicher & Schüll/ Dassel
Nonidet P40	Roth/ Karlsruhe
Medium (Hefeextrakt, Pepton)	Difco/ Detroit
AG 501-X8 (mesh 20-50)	Bio Rad/ Richmond
Protein A Sepharose	Deutsche Pharmacia/ Freiburg
Sarcosyl NL 35	Ciba-Geigy/ Basel
SDS	Serva/ Heidelberg
Sephadex G50, G100	Deutsche Pharmacia/ Freiburg
Sepharose CL 4B	Deutsche Pharmacia/ Freiburg
Streptomycin	Serva/ Heidelberg
Tris	Sigma/ St. Louis
Triton X 100	Serva/ Heidelberg
Radioaktive Substanzen	NEN/ Boston

t-RNA (aus Kalbsleber)

Amersham-Buchler/ Braunschweig

Boehringer/ Mannheim

3. Abkürzungen

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
bNGF	Rinder Nervenwachstumsfaktor
β -NGF	Dimer des Maus NGF MG =26000
bp	Basenpaare
BU	biologische Einheit =4-5 ng/ml
cpm	meßbare Zerfälle pro Minute
cDNA ^{mNGF}	klonierte cDNA v. Maus NGF
dA (C,G,T)TP	Desoxyadenosin(cytidin,guanosin,thymidin) triphosphat
DEP	Diäthylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EB	Ethidiumbromid
EDTA	Äthylendiamintetraazetat
EIT	Enzymimmuntest
ER	endoplasmatisches Retikulum
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
gpNGF	Meerschweinchen NGF
hNGF	menschlicher NGF
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
7S NGF	NGF Komplex in der Maus- speicheldrüse
HMW- Komplex	hochmolekularer Komplex
IEF	isoelektrische Fokussierung
KLH	Hämocyanin der Napfschnecke
M	molare Konzentration
MG	Molekulargewicht
M _r	relative Molekularmasse

min	Minute
mM	millimolare Konzentration
NC	Nitrozellulose
2,5S NGF	das aminoterminal Oктаpeptid u./oder das endständ. Arginin von NGF fehlt
NaP _i	Natriumphosphat Puffer
NEPHGE	"non equilibrium pH gel electrophoresis"
NP 40	Äthylphenylpolyäthylenglykol
NPF	Neurite promoting factor
mNGF	Maus Nervenwachstumsfaktor
mRNA	Boten Ribonukleinsäure
OD	optische Dichte
Pipes	1,4 Piperazindiäthansulfonsäure
PEG	Polyäthylenglykol
PER	Ammoniumpersulfat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POPOP	1,4-Di-2-(5-Phenyloxazolyl)-Benzol
poly (A) ⁺ RNA	polyadenylierte RNA
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRP	Signal recognition particle
ss	einzelsträngig
SSC	Standard-Saline-Citrat Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N',- Tetramethyläthylendiamin
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEB	Tris-EDTA-Borat Puffer
TPCK	Tosyl-L-Phenylalanin-chlormethylketon
Tfm	Testikuläre Feminisierungsmutation
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X-100	Cethylphenoxypolyäthoxyäthanol
t-RNA	Transfer RNA
Upm	Umdrehungen pro Minute
X- Gal	5-Bromo-4chloro-indolyl β -D-galaktosid

4. Medium und Puffer

YT Vollmedium

Baktotrypton	10-15g
Hefeextrakt	5g
NaCl	5g
Glukose	0,1% (w/v)
aqua dest.	ad 1l

M9 Minimalmedium (supplementiert mit Thiamin)

Na_2HPO_4	6g	1ml 1M MgSO_4
KH_2PO_4	3g	1ml 0,1M CaCl_2
NaCl	0,5g	1ml 1M Thiamin- HCl
NH_4Cl	1g	5ml 40% Glukose
aqua dest. ad 500ml		ad 500 ml

getrennt autoklavieren und nach dem Abkühlen vereinen

2x Medium zum Einfrieren von Zellen

$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$	16,50g
$\text{Na}_3\text{-Zitrat} \times 2\text{H}_2\text{O}$	1,24g
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,18g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,80g
KH_2PO_4	3,60g
Glycerin	88,00g
aqua dest.	ad 1l

durch Autoklavieren sterilisieren

SOB-Medium

Baktotrypton		20g
Hefeextrakt		5g
NaCl	(fc. 10mM)	2ml 5M NaCl
KCl	(fc. 2,5mM)	1.25ml 2M KCl
aqua dest.		ad 980ml

autoklavieren und nachträglich 10ml 2M Mg^{2+} -Vorratslösung
(1M $MgCl_2$, 1M $MgSO_4$) zusetzen.

SOC-Medium

wie SOB-Medium, jedoch mit 20mM Glukose

YT Medium mit Antibiotika

Nach dem Autoklavieren zusetzen:

	fc.
Ampicillin (in 50mM Tris pH 7.4)	50 µg/ml
Chloramphenicol (in 70% Alkohol)	25 µg/ml
Streptomycin (in H_2O)	25 µg/ml

Platten für Vollmedium und Minimalmedium

Dem Medium wird vor dem Autoklavieren 15g Agar/1l zugesetzt.

B-Broth Platten für M13 mp Phagen

Baktotrypton	10g
NaCl	8g
1% Vitamin B1 Lsg.	1ml
Agar	15-20g
(für Top- Agar	6g)
aqua dest.	1l

Weitere Zusätze zu 3ml Top- Agar:

- 30µl X-Gal (20mg/ml in Dimethylformamid)
- 20µl IPTG (24mg/ml in H₂O steril filtrieren)
- 30µl Ampicillin (5,0mg/ml in 50mM Tris pH 7.5)

TEB-Puffer

Tris	89mM
EDTA	4mM
Borsäure	89mM
pH 8,3	

TE-Puffer

Tris	10mM
EDTA	1mM
gewünschten pH mit HCl einstellen	

Neutralisationspuffer

Natriumchlorid	0,5 M
HCl	0,12 M
Tris/HCl pH 7,5	0,125M

20x SSC

Natriumchlorid	3 M
Natriumzitat	0,3M
mit Zitronensäure pH 7,2 einstellen	

20x Denhardt's

Ficoll	0,4%
BSA	0,4%
Polyvinylpyrrolidon MG 360 000	0,4%

Reverser Transkriptase Mix

1M Tris/HCl pH 8,3 (bei 42° C)	20µl
1M MgAc	4µl
2M KCl	20µl
10 mM dNTP (dT,dG,dC) jeweils	40µl
10 mM dATP	10µl
oligo dT ₁₂₋₁₈ 1mg/ml	24µl
1M DTT	4µl
H ₂ O	38µl
	240µl

2x Tailing Puffer

1,2M Natriumcacodylat	0,25ml
pH 7,2	
1mM DTT	0,25ml
dest. H ₂ O	0,75ml

2x Klenow Puffer

0,2M Hepes
0,14M KCl
20mM MgCl ₂
5mM DTT
1mM jedes der 4 dNTP

20x RNA Puffer (steril)

800mM Tris/HCl
720mM NaH_2PO_4 pH 7,4
40mM EDTA

RNA-Probenpuffer (steril)

40mM Tris/ HCl
36mM NaH_2PO_4 pH 7,4
2mM EDTA
0,1% (w/v) Bromphenolblau

Cäsiumchlorid Lösung : 1g/ml in TE auf Brechzahl
 $n = 1,390$ einstellen
Ethidiumbromid- Lösung : 10mg/ml in TE
Alkal. Lysis Puffer I : 50mM Glukose, 25mM Tris/
HCl pH 8,0, 10mM EDTA
Alkal. Lysis Puffer II : 0,2N NaOH, 1% SDS jeweils frisch
Alkal. Lysis Puffer III : 3M KAc, 1,8M Ameisensäure
Acetat Mops Puffer : 1M NaAc pH 8,0 mit NaOH einstellen
50mM MOPS (Morpholinopropansulfonsäure)
Lithiumchlorid : 5M LiCl, 50mM MOPS pH 8,0

Probenpuffer für Sequenzgele :

80%(v/v) Formamid, 10mM NaOH, 1mM EDTA, 0,1%(w/v) Xylencyanol,
0,1% Bromphenolblau.

5. Proteinbestimmung

Sie wird entweder nach Lowry et al. (1951) in einem Mikroansatz für den Bereich zwischen 5-100 µg Protein oder nach Bradford et al. (1976) durchgeführt.

Lowry:

Für die Meßpunkte einer Standardkurve werden geeignete Verdünnungen von BSA zwischen 5 und 100µg Protein in 150µl H₂O angesetzt. Die unbekannte Proteinlösung wird mehrmals in geeigneter Weise verdünnt und gleichfalls auf 150µl Endvolumen gebracht.

Die Proben werden mit 0,4N Natronlauge ad 0,2ml aufgefüllt und zu jedem Ansatz wird 1ml frischangesetztes Kupfer-Reagenz zugegeben (50ml 2%ige (w/v) Na₂CO₃ in 0.1N NaOH; 0,5ml 2%ige (w/v) Natrium-Kalium-Tartrat Lsg., 0,5ml 1%ige (w/v) CuSO₄ · xH₂O). Nun fügt man noch 0,1ml 1:2 frisch verdünntes Folin-Reagenz zu, mischt und inkubiert die Proben 30min-1h bei Raumtemperatur.

Die Extinktion wird bei $\lambda = 750\text{nm}$ gegen den Leerwert gemessen. Die OD_{750nm}-Werte werden gegen den Proteinstandard aufgetragen und aus der Standardkurve läßt sich der unbekannte Proteingehalt der Probe ermitteln.

Bradford:

Die Proteinstandardproben (1-20 µg Protein) werden in 0,8 ml Wasser gelöst und 0,2 ml 5x konzentriertes Farbreagenz (100mg Coomassie Brilliant Blue G250 in 200 ml Wasser) werden zugesetzt. Die Proteinproben müssen nun "gevortext" werden. Die Extinktion wird bei der Wellenlänge 595nm nach 5min bis 1h gegen den Leerwert ermittelt. Die Inkubationsdauer bei RT sollte, wie auch bei der Lowry-Bestimmung, für alle Proben zum Zeitpunkt der Messung gleich sein. Die Bestimmung der unbekannten Proteinmenge erfolgt wie oben. Im angegebenen Meßbereich besteht ein linearer Kurvenverlauf.

6. Kultivierung von PC 12 Zellen

PC 12 Pheochromozytoma Zellen wurden in Plastik-Gewebekulturschalen in Dulbeccos modifiziertem Eagles Medium kultiviert. Zu diesem Medium wurde 10% Pferdeserum und 5% Kalbserum zugesetzt (Heumann et al. 1984).

7. Kovalente Kopplung von Protein und Peptiden an Trägerprotein

N-Succinimidyl 3(2 pyridyldithio)propionat, SPDP, ist ein bifunktionelles Reagenz (Carlsson et al. 1978) und ermöglicht unter milden Bedingungen, Proteinmoleküle miteinander reversibel kovalent zu verknüpfen. Eine Homopolymerisation der Kopplungspartner kann ausgeschlossen werden. Ca. 20nmol Trägerprotein (z.B. Thyreoglobulin) wird in gepufferter Kochsalzlösung (0,1M NaP_i pH 7,5, 0,1M NaCl) aufgenommen. Der Koppler SPDP wird in Äthanol (Endkonz. 20mM) gelöst und zum Protein (15mg/ml) in einem 20fachen molaren Überschuß unter Rühren zugesetzt. Die Reaktion wird nach 30min bei Raumtemperatur (gelegentlich vortexen) durch Gelfiltration über Sephadex G25 beendet. Zur Abschätzung des Substitutionsgrades eingeführter 2-Pyridyldisulfidreste mißt man nach dem Sephadex G25 Schritt die Absorption bei 280nm. Zu einem Aliquot dieser Proteinlösung setzt man 50µl DTT (100mM) in dest. H₂O pro ml zu. Durch Messung der Extinktion bei 343nm läßt sich die Konzentration des freigesetzten Pyridin-2-thions abschätzen (der molare Extinktionskoeffizient ist $\epsilon_{343nm} = 8,08 \cdot 10^3 \cdot M^{-1} cm^{-1}$). Diese Konzentration ist äquivalent der Konzentration an eingeführten 2-Pyridyldisulfidresten.

Zur Kopplung von BSA an Thyreoglobulin wurden 1,3nmol modifiziertes Thyreoglobulin mit 13nmol BSA vermischt (Proteinkonz. ca. 2mg/ml) und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Ein weiteres gängiges heterobifunktionelles Kopplungsreagenz ist m-Maleimidobenzoyl-n-hydroxysuccinimidester (MBS). Die Konjugation der Partner ist irreversibel. Die Kopplung von NGF an BSA wurde im wesentlichen nach den Bedingungen von O'Sullivan et al. (1979) durchgeführt:

I. Reaktionsschritt

0,8mg NGF (Aminogruppen-Donator) wurden in 0,4ml Puffer (0,1M NaP_i pH 7,5, 50mM NaCl) mit einem 5fachen molaren Überschuß an MBS (in 10 μ l Tetrahydrofuran) versetzt; die so gestartete Reaktion wurde 1h bei 30°C geschüttelt. Nicht an der Reaktion teilgenommenes MBS wurde über eine 30cm lange Sephadex G25 Säule abgetrennt.

II. Reaktionsschritt

15nmol modifizierter NGF reagieren mit 5nmol BSA (besitzt freie SH-Gruppen) in 2ml Reaktionspuffer (0,1M NaP_i pH 7,5, 50mM NaCl, 10mM MgCl_2) 1h lang bei 30°C. Der Ansatz wurde mit 10mM 2-Mercaptoäthanol gestoppt.

III. Reaktionsschritt

Die Reduktion und Carboxymethylierung erfolgte nach Vorschlägen von Waxdal et al. (1968), Crestfield et al. (1963) und Shooter et al. (1978). Das Konjugat wurde gegen 8M Harnstoff, 0,5M Tris pH 8,1, 2mg/ml EDTA dialysiert. Nach einem mehrstündigen Pufferaustausch erfolgte die Zugabe von 300mol DTT pro mol Protein. Die Lösung wurde mit Stickstoff überschichtet und 4h bei RT inkubiert. Nach dem Zusatz eines 4fachen molaren Überschusses an Jodessigsäure gegenüber DTT wurde der pH kontrolliert und mit 1M Ammoniaklösung auf 8,1 nachgestellt. Die nun einsetzende Alkylierung erfolgte für 20min im Dunkeln. Niedermolekulare Bestandteile wurden vom

Protein über eine Sephadex G10 Säule ($0,01\text{M NH}_4\text{HCO}_3$ pH 8,1) abgetrennt. Die Probe war nun lyophilisierbar und konnte in physiologische Kochsalzlösung aufgenommen werden.

Die Kopplung eines synthetischen 17-mer Peptids aus der Vorläufersequenz von prä-pro-NGF (PEAHWTKLQHS�DTALR) an BSA ist im molaren Verhältnis 10:1 mit Glutaraldehyd durchgeführt worden. In 20mM NaP_i Puffer pH 7,5 wurden $0,02\mu\text{mol}$ BSA mit $0,2\mu\text{mol}$ Peptid in Gegenwart von 0,8% Glutaraldehyd in einem Volumen von 0,1ml über Nacht (16-18h) bei RT vernetzt. Das Kopplungsprodukt wurde gegen 20mM NaP_i Puffer pH 7,5, 150mM NaCl dialysiert und bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Unter den gleichen Bedingungen ließ sich das Peptid auch an Myoglobin koppeln. Für die Vernetzung der Kopplungspartner mit wasserlöslichem Carbodiimid (1-Äthyl-3-(3-Dimethylamino-propyl)Carbodiimid, ECDI) wurde anstelle von Glutaraldehyd 5mg ECDI zugesetzt und sonst ganz analog verfahren.

8. Thiocyanylieung von β -NGF

Nach Degani et al. (1970) lassen sich die Disulfidgruppen eines Proteins quantitativ thiocyanylieren. In Anlehnung an dieses Verfahren wurde 2,5S NGF in Stickstoff gesättigten NaP_i -Puffer pH 7,4, 1mM EDTA mit einer Konzentration von 5mg/ml gelöst und mit 1% SDS denaturiert. Durch 5-minütiges Kochen in Gegenwart von 3% 2-Mercaptoäthanol erfolgt die Reduktion des Proteins. Durch Gefriertrocknen über Nacht ließ sich das Reduktionsmittel wieder entfernen. Nach der Wiederaufnahme in dest. H_2O geschah die Substitutionsreaktion über Nacht bei einem 10fachen molaren Überschuß an 2-Nitro-5thiocyanobenzoat. Der Reaktionsverlauf kann durch Messung der Absorption bei 412nm ($\epsilon_M=13600$) verfolgt werden.

Eine nachträgliche intermolekulare Vernetzung mit 2% Glutaraldehyd kann nach Bedarf noch zusätzlich durchgeführt werden.

9. Immunisierung von Kaninchen und Gewinnung der Antiseren

Für alle Immunisierungen wurden weiße Neuseeland Kaninchen von Ivanovas (Kissleg) bezogen. Drei Tieren (2-3kg) wurde 150µg modifizierter, denaturierter 2,5S NGF zusammen mit kompletten Freundschens Adjuvans rechts und links der Wirbelsäule in vier Nestern subkutan appliziert. Bei einem weiteren Kaninchen wurde das Immunogen vor der Verabreichung noch mit Glutaraldehyd vernetzt. Die erste Booster-Injektion geschah zwei Wochen später mit inkompletten Freundschens Adjuvans. Alle weiteren Injektionen folgten in 4-wöchigem Abstand.

Für die Produzierung von Antiseren gegen Peptid ist im wesentlichen nach einer Vorschrift von Kagan und Glick (1979) vorgegangen worden. Dieser Immunisierungsplan ist in Serien eingeteilt. Jede Serie besteht aus drei Applikationen in zweiwöchigem Abstand. 10-14 Tage nach der 3. Injektion einer Serie wird dem Tier Blut entnommen und auf die Immunantwort hin untersucht. Tiere mit einer schlechten Immunreaktion werden ausgeschlossen. Insgesamt wurden neun Kaninchen mit jeweils 100-150µg Peptid in Verbindung mit Freundschens Adjuvans immunisiert. Jeweils drei Tieren wurde freies Peptid, mit Glutaraldehyd an BSA gekoppltes Peptid und mit Carbodiimid an BSA gekoppeltes Peptid (siehe Seite 19) gespritzt. Im Laufe der Immunisierung wurden 2 Tiere der ersten und zwei Tiere der dritten Gruppe von nachfolgenden Injektionen ausgeschlossen.

Die Blutentnahme erfolgt durch Anritzen der hinteren Ohrvene nach zuvorigem Einreiben des Ohrs in diesem Bereich mit Xylol. Das aufgefangene Blut gerinnt innerhalb weniger Minuten in den sterilen, bereitgestellten Glasröhrchen. Der Blutkuchen wird etwas zerkleinert und über Nacht bei 4°C gelagert. Nach ca. 12h wird das Serum abgenommen, evtl. niedertourig zentrifugiert, aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Bisweilen ist das Komplementsystem durch Erhitzen des Serums auf 56°C für 10min inaktiviert worden.

10. Enzymimmunttest

Mit der Schleicher & Schüll Minifold Absauganlage wird an Protein (z.B. Myoglobin) gekoppeltes Peptid (5-10µg) auf ein angefeuchtetes Nitrozellulosefilter ($\leq 0,45\mu\text{m}$) gesaugt. Die NC-Filter werden bei RT getrocknet. Sie werden kurz in 50mM Tris/HCl pH 7,4, 5mM EDTA, 150mM NaCl, 0,5% Nonidet P 40 (TEN-N) gespült und für 90min in den selben Puffer mit 10% Ziegenpräimmunserum zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen überführt. Die Filter nun kurz in TEN-N spülen und mit dem entsprechend verdünnten Antiserum überschichten. Hierzu dem TEN-N Puffer 0,25%(w/v) Gelatine (TENG-N) beisetzen. 2h bei RT unter Schütteln inkubieren. Die Filter 30min lang bei 4maligem Wechsel in TEN-N Puffer spülen. Erneut in TEN-N mit 10% Ziegenserum für 15min einbringen. Die Filter nun in 1:400 mit TENG-N verdünnte Anti-Kaninchen IgGs überführen, an die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist (Firma Nordic 12-182). 2h bei RT inkubieren. 2x die Filter mit TEN-N spülen und über Nacht bei 4°C in diesem Puffer stehen lassen. Nochmals 2x spülen.

Farbreaktion: Chloronaphtol 3mg/ml in Methanol lösen. 10ml dieser Stammlösung mit 50ml Puffer (50mM Tris/HCl pH 7,4, 150mM NaCl) verdünnen und H_2O_2 bis zu einer Konzentration

von 0,01% zusetzen. Filter in dieser Lösung für 15min oder länger bei RT inkubieren. Die Farbreaktion durch Spülen mit Wasser abstoppen; Filter trocknen.

11. Präparation eines 100.000g Proteinhomogenates der submaxillaren Speicheldrüse

In Anlehnung an die Prozedur von Berger et al. (1977) wird die Speicheldrüse der Maus entnommen, etwas zerkleinert, und 75mg Gewebe (Naßgewicht) wird in 1ml eiskalten Puffer homogenisiert. Hierzu wurde ein Motor angetriebener Glashomogenisator mit Teflon Pistill verwendet. Der Homogenisierungspuffer enthält: 50mM Natriumazetat pH 4.0, 200µg/ml Natriumazid, 50µg/ml pankreatischer Trypsininhibitor (Sigma), 5mM PMSF, 1mM Leupeptin und 1% (w/v) Triton X-100. Das Homogenat wird bei 100.000g für 1h bei 4°C zentrifugiert. Der Protein-gehalt des Überstandes wird nach Lowry bestimmt und bei -70°C eingefroren.

12. Jodierung

Die Jodierung von NGF wurde mit Laktoperoxidase nach der Methode von Marchalonis (1969), modifiziert von Rohrer (1982), durchgeführt. Der Ansatz enthält:

6µg NGF in 0,1M NaP_i, pH 7.3
1µg Laktoperoxidase in 0,1M NaP_i, pH 7,3
1mCi Na¹²⁵I in wässriger NaOH, pH 7-11

9nmol H_2O_2 in 0,1M NaP_i pH 7,3

Nach 30 min auf Eis wird nochmals 9nmol H_2O_2 zupipettiert und der Reaktionsansatz wird weiter für 90 min auf Eis gestellt. Jodid und elementares Jod lassen sich vom markierten Protein durch Gelfiltration über eine Biogel P30 Säule abtrennen. Der Laufpuffer war 0,1M NaP_i pH 7,3. Das Protein erscheint im Ausschlußvolumen der Säule und kann bei 4°C gelagert werden.

Protein A läßt sich sehr schonend mit Bolton-Hunter-Reagenz jodieren (siehe Langone 1980). Hierzu werden 200µCi des Reagenz (1400Ci/mmol) vollständig durch Überblasen mit Stickstoff eingedampft. 5µg Protein A wird in 100µl 50mM NaP_i pH 8,0 zugesetzt und nach dem Mischen für 15min bei RT inkubiert. 100µg Glycin (100µl einer 1mg/ml Lösung) wird zum Ansatz zugegeben und für weitere 30min inkubiert. Die Abtrennung nicht eingebauter Radioaktivität erfolgt in gleicher Weise wie bei der Laktoperoxidase Methode (siehe oben). Die erreichte spezifische Radioaktivität lag bei 5000Ci/mmol und mehr.

13. Jodierung von Proteinen im Polyacrylamidgel

Die Methode wurde nach Elder et al. 1977 durchgeführt. Proteine werden in einem 1,5mm dicken, senkrechten SDS-Polyacrylamid Gel (Laemmli 1970) aufgetrennt und mit 0,25% Coomassie Blau R 250 in 5:5:1 Methanol:Wasser :Essigsäure angefärbt und in gleicher Mischung entfärbt. Die Proteinbanden werden ausgeschnitten und kräftig wie folgt gespült: 1 Tag 25% Isopropanol, 10% Essigsäure; 3 Tage 25% Isopropanol; 1 Tag 10% Methanol. Daraufhin werden die Gelstückchen voll-

ständig im Lyophilisator getrocknet.

Für die Jodierung werden folgende Komponenten zum Gelstückchen zugesetzt: 20µl 0,5M NaP_i pH 7,5, 100-300µCi ^{125}J (17mCi/mol) in 5µl und 5µl Chloramin T (1mg/ml). Gelstückchen für 1h in dieser Mischung quellen lassen, dann die Reaktion mit Natriumbisulfit (1mg/ml) stoppen. Nach 15min die Bisulfitlösung entfernen und die Gelstückchen in silikonisierte, durchlöchernte Eppendorfgefäße stecken und 24-36h unter Rühren in 10% Methanol spülen. Nach ca. 5h das erste Mal das Lösungsmittel austauschen. Diese Waschprozedur solange fortsetzen bis die Radioaktivität im Lösungsmittel deutlich abgenommen hat. Gelstücke erneut durch Lyophilisieren trocknen.

Für die Fingerprint Analyse werden die Gelstücke in 0,5ml 0,05M NH_4HCO_3 Puffer pH 8.0 mit 25µg/ml Trypsin und 25µg/ml Chymotrypsin für 24h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 5minütiges Kochen abgestoppt. Die Gelstücke können falls erforderlich reextrahiert werden. Die Überstände werden lyophilisiert. Unmittelbar vor der Auftrennung der Peptide wird die Probe in 20µl Laufmittel I (Essigsäure: Ameisensäure:Wasser 15:5:80) gelöst, und 1-5µl ($0,5-1 \times 10^6$) werden auf Zellulosedünnschichtplatten (S&S DC-Fertigplatten 20x20cm; F 1440) aufgetragen. Anschließend werden die Peptide in Lösungsmittel I bei ca. 500V elektrophoretisch aufgetrennt. Damit der Verlauf der Elektrophorese per Auge verfolgt werden kann, wird im Laufmittel 2% (w/v) Orange G und 1% (w/v) saures Fuchsin gelöst und auf der gegenüberliegenden Seite aufgetragen. Nachdem die Farbstoffe eine konstante Wegstrecke zurückgelegt haben, wird die Platte im Abzug getrocknet, um 90° gegenüber der ersten Auftrennung gedreht und für die zweite Dimension einer aufsteigenden Chromatographie mit dem Laufmittel Butanol:Pyridin:Essigsäure:Wasser 32,5:25:5:20 unterworfen. Nach dem Trocknen der Platte schließt sich die Autoradiographie an.

Für den Identitätsnachweis zweier Peptide werden beide von der Platte gekratzt und mit Laufmittel I aus der Zellulose extrahiert. Die Überstände werden abgenommen, gänzlich

eingedampft, erneut in Lösung gebracht und gemeinsam zweidimensional aufgetrennt. Falls erforderlich, kann nach der Extraktion des Peptids, dieses noch mit einer weiteren Protease subverdaut werden.

14. Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Bis zu 100µg Protein wird in 62,5mM Tris/HCl pH 6,8, 5% Mercaptoäthanol, 2,25% SDS, 15% Glycerin und 0.001% Bromphenolblau aufgenommen und für 2min durch Kochen reduziert. Die Auftrennung der Proben erfolgt in 12 oder 15% Polyacrylamidgelen nach der Methode von Laemmli (1970). Die Konzentrationen im Trenngel sind: 0,375M Tris/HCL pH8.8 und 0,1% SDS. Das Sammelgel ist ca. 1cm hoch und enthält 0,125M Tris/HCl pH 6.8 und 0,1% SDS. Beide Geltypen werden chemisch mit Tetramethyläthylendiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (PER) polymerisiert. Der Elektrodenpuffer (pH 8,6-8,8 enthält 0,025M Tris, 0,192M Glycin u. 0,1% SDS. Die Gele werden mit 0,25% Coomassie Blau R 250 in 5:5:1 = Methanol:Wasser:Essigsäure angefärbt und im gleichen Lösungsmittelgemisch entfärbt.

Für die Fluorographie wird das säurefixierte Gel für 30min in Wasser gespült und dann für den gleichen Zeitraum in 1M Natriumsalicylat überführt. Nach dem Trocknen des Gels kann es bei -70°C exponiert werden.

Für die 2-dimensionale Auftrennung der Proteine wird ein "non-equilibrium pH" Gel pH 3,5-10 (O'Farrell 1977) mit einem Laemmli Gel kombiniert. Das zylindrische Gel für die erste Dimension hat folgende Zusammensetzung: 3,8% Acrylamid, 0,2% N,N-Methylen-Bisacrylamid, 9M Harnstoff, 2% Nonidet P40, 2% (v/v) Ampholine pH 3,5-10, 0,2mg PER pro ml und

0,14% (v/v) TEMED. Nach dem Gießen werden die Röhrchen für die Polymerisation (1-2h) mit H_2O überschichtet. Die Anodenlösung ist 0,01M Phosphorsäure, die Kathode taucht in 0,02M NaOH ein. Die Probe wird auf Seite der Anode durch Unterschichten der Phosphorsäure auf das 2mm dicke Röhrchengel aufgetragen. Das Protein (bis 500µg) wird in 15µl Probenpuffer II (0,5% SDS, 9,5M Harnstoff, 0,2% Ampholine pH 3,5-10 und 0,01M DTT) gelöst und 10min bei RT inkubiert; anschließend wird die Probe mit 15µl Puffer I (9,5M Harnstoff, 2% Nonidet P40, 2% Ampholine pH 3,5-10, 5% Mercaptoäthanol) verdünnt. Die aufgetragene Proteinlösung wird zusätzlich noch mit 60µl der Lösung III (5% Nonidet P40, 1% Ampholine pH 3,5-10, 8M Harnstoff) überschichtet. Eine Probe enthält 500µg Cytochrom c (besitzt einen ähnlichen isoelektrischen Pkt. wie NGF) und dient als Anhaltspunkt für den zeitlichen Verlauf der Fokussierung. Die angelegte Spannung beträgt ca. 500V. Die Elektrophorese wird abgebrochen, sobald Cytochrom c das untere Ende des Röhrchens erreicht hat. Das Gel wird durch Druck aus dem Glasrohr herausgepreßt und für 2h in 5ml SDS-Äquilibriumspuffer (0,0625M Tris/HCl pH 6,8, 2,3% SDS, 5% Mercaptoäthanol und 10% Glycerin) inkubiert. Das Rundgel wird nun oben quer in den konischen Schlitz eines Laemmli Gels gelegt und mit 1%iger Agarose in seiner Position fixiert. Zur Markierung der Lösungsmittelfront wird quer über das Gel 1% Bromphenolblau in 10% Glycerin aufgetragen. Das Sammelgel der zweiten Dimension ist 2-2,5 cm hoch.

15. Immunblotten

Der Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen läßt sich am besten elektrophoretisch nach Towbin et al. (1979) bewerkstelligen. Nach der Gelelektrophorese (Laemmli 1970) wird

das Sammelgel entfernt, und das Trenngel zusammen mit einem passend zugeschnittenen Nitrozellulosefilter zwischen zwei Lagen Whatman 3MM Papier gesteckt. Alle Bestandteile werden vorher mit entgasten Elektrodenpuffer (20mM Tris, 150 mM Glycin, 20% Methanol pH 8.3) gut durchfeuchtet, um Luftblasen zwischen den Lagen zu vermeiden. Dieses "Sandwich" wird mit einem durchnässten Reinigungsschwamm vorn und hinten in die Halterung der Trans-Blot Kammer eingeklemmt, mit Gummibändern fixiert und senkrecht in die mit Puffer gefüllte Kammer gestellt, so daß die Nitrozellulose in Richtung Anode der Kammer weist. Für ein 15%-iges Gel ist bei einer angelegten Feldstärke von 6-8 V/cm eine Transferdauer von ca. 16h erforderlich. Für einen partiellen Transfer genügen 8-9h.

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen müssen zunächst unspezifische Bindungsstellen durch die Inkubation des Filters in 1% Gelatine, 50mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,05% Azid, 10% Ziegenserum (wird als zusätzliches Trägerprotein verwendet) abgesättigt werden (1h bei RT). Nach kurzem Spülen in TENG-N Puffer (50mM Tris/HCl pH 7,5, 5mM EDTA, 150mM NaCl, 0,25% Gelatine, 0,5% Nonidet P 40) wird das Filter mit dem spezifischen Antiserum (die Kaninchenantisera wurden 1:100 verdünnt) oder mit Präimmunserum in TENG-N inklusiv 10% "Carrierserum" (Ziege) für 2-4h überschichtet. Das Filter wird 30min bei RT in TENG-N gespült, anschließend wird es mit einer Lösung von jodiertem Protein A oder jodierten Anti-Immunglobulin Antikörpern ($0,5-1 \times 10^6$ cpm /ml) überschichtet und hierin für 30min bei RT inkubiert. Überschüssige Radioaktivität wird mit TENG-N entfernt. Eine unspezifische radioaktive Bindung kann durch mehrmaliges Spülen mit dem Puffer: 50mM Tris pH 7,4, 5mM EDTA, 150mM NaCl, 0,25% Gelatine, 0,5% Triton X-100 und 0,1% SDS gesenkt werden. Das Filter wird mit Verstärkerfolie bei -70°C autoradiographiert.

Ein bereits benutztes Filter kann wiederverwendet werden:

Der Antigen-Antikörper Komplex läßt sich durch Waschung in 0,1M Glycin/HCl pH 2,2, 20mM MgAc_2 , 50mM KCl für 90min bei

RT zerstören. Das Filter wird durch Neutralisation in TENG-N und erneutes Absättigen in 10% Carrierserum regeneriert und kann mit einem zweiten Antiserum bzw. dem Präimmunserum reagieren (Legocki et al.1981).

Besonders beim 2D-Immunblot bewährt es sich, die unspezifische Bindung des Antiserums durch Vorinkubation des Filters mit Präimmunserum teilweise bis vollständig zu unterdrücken. Die zusätzlichen notwendigen Schritte bei RT sind wie folgt:

Absättigen mit Präimmunserum:	≥ 2h
Waschen des Filters in TENG-N:	≤ 1h
Inkubation des Filters mit Antikaninchen IgGs	: 3-4h
Spülen mit TENG-N	: ≤ 1h
Inkubation mit spezif. Antiserum	: ≥ 2h
Spülen mit TENG-N	: ≥ 0,5h
etc. (siehe oben)	

Der zweite Antikörper kann für einen enzymatischen Nachweis mit Peroxidase gekoppelt sein. Als Substrat bietet sich das sehr cancerogene Diaminobenzidin (DAB) an. Gegenstände, die mit DAB in Berührung kommen, sollten mit Natriumhypochlorit abgewischt werden. 9 Teile einer 0,03% (w/v) DAB Lösung in 100mM NaP_i pH 7,3 werden mit 1 Teil 0,1%iger frisch angesetzter H₂O₂ Lösung gemischt (Graham et al. 1966). Die NC-Filter werden hierin lichtgeschützt inkubiert. Die Reaktion läßt sich durch Spülen mit Wasser abstoppen. Durch folgende Variante nach Adams (1981) wird der Nachweis wesentlich empfindlicher. Zu 5mg DAB in 10ml 0,1M NaP_i pH 7,3 wird tropfenweise unter Rühren 0,25ml 1% (w/v) CoCl₂ und 0,2ml 1% (w/v) Nickelammoniumsulfat zugesetzt. Zu dieser Lösung werden 0,032ml 3%iges H₂O₂ zugegeben; die Filter werden für 15min hierin inkubiert.

16. In vitro Translation von mRNA in einem Kaninchen Retikulozytenlysate

16.1 Präparation eines Lysates (Mac Donald)

Um anämisches Blut zu erhalten, muß einem Kaninchen (2-3kg) täglich 0,3ml/kg frisch angesetztes 2,5%iges Phenylhydrazin in 0,15M NaAc pH 7 in den Nacken subkutan injiziert werden. Am 5.Tag wird die Behandlung dann abgebrochen. Am 7.Tag wird das Tier narkotisiert, und das Blut durch Herzpunktion mit einer 60ml Spritze entnommen. Die Spritze sollte vorher mit einer Heparin Lösung gespült werden. Das Blut wird in sterilen, eiskalten Zentrifugenröhrchen gesammelt, die 1000U gelöstes Heparin enthalten. Es wird bei 2000Upm, 0°C für 10min im HB-4 Sorvall Rotor zentrifugiert. Das Serum wird durch Absaugen entfernt. Die Zellen werden behutsam in steriler, eiskalter Salzlösung (130mM NaCl, 2,5mM KCl, 7,5mM MgCl₂) resuspendiert und wie oben sedimentiert. Die Waschprozedur muß im allgemeinen 3-5mal wiederholt werden bis keine Leukozyten mehr zu sehen sind. Die gewaschenen Zellen werden, mit einer ihrem Eigenvolumen entsprechenden Menge Wasser (0°C steril), bei kräftigem Vortexen lysiert. Die Zelltrümmer werden durch Zentrifugation (20.000g, 0°C, 15min) entfernt. Der Überstand wird zu je 0,5ml aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

16.2 Behandlung des Lysates mit Mikrokokkus Nuklease (Molecular cloning Maniatis)

Der Abbau der endogenen mRNA sollte noch vor dem ersten Einfrieren des Lysates vorgenommen werden, da jedes unnötige Auftauen die Aktivität des Lysates mindert.

Hämin-Vorratslösung:

20mg Hämin werden in 0,4ml 0,2M KOH gelöst. Man setzt 0,6ml quarzdest. H_2O (steril) und 0,1ml Tris/HCl pH 7,8 (steril) zu und stellt den pH auf 7,8 mit 0,1M HCl neu ein. 4ml Äthylenglykol werden zugegeben und nach dem Mischen wird die Lösung bei 5000g abzentrifugiert; der Überstand wird bei 4°C gelagert.

Zu 100 Teilen Lysat werden 1 Teil Häminlösung und 2 Teile 50mM $CaCl_2$ zugesetzt; nach dem Mischen werden 0,05 Teile Mikrokokus Nuklease (150.000U/ml in 50mM Glycin pH 9,2, 5mM $CaCl_2$; Lagerung aliquotiert bei -70°C) zugegeben, und das Lysat wird 15min bei 20°C inkubiert. Die Reaktion wird mit 2 Teilen 100mM EGTA unter Mischen abgestoppt. Abschließend werden 0,4 Teile Kreatinphosphokinase (Typ I in 50% Glycerin -20°C) 40 Einheiten/ml zugesetzt und nochmals gemischt. Das so behandelte Lysat läßt sich in $\leq$ 0,5ml Portionen bei -80°C lagern.

16.3. Abschätzung der Syntheseleistung

Als Maß für die Menge synthetisierter Proteine wird der Einbau von ^{35}S -Methionin und/oder Cystein in TCA fällbares Material herangezogen. Aliquote des in vitro Translationsansatzes werden zusammen mit 0,5mg BSA in 0,5ml H_2O aufgenommen. Nach dem Zusatz von 0,25ml Bleichlösung (1N NaOH, 0,5M H_2O_2 , 1mg/ml Methionin) werden die Proben 20min bei 37°C inkubiert, um die Peptidyl-tRNA Komplexe zu hydrolysieren. In vitro synthetisierte Polypeptide werden durch den Zusatz von 0,5ml eiskalter 25% TCA gefällt. Die Proben sollen nun mindestens 20min auf Eis stehen. Sie werden auf Whatman Glasfaserfilter gesaugt (GF/A), und jeder Filter wird mit 15ml 8% TCA, 5ml Äthanol und zum Schluß mit 10ml Diäthyläther nachgespült. Nach dem Trocknen wird die Radioaktivität in Toluolszintillator (PPO 5g, POPOP 0,1g, Toluol 667ml u. Triton X 100 333ml) ausgezählt. Die zum Zeitpunkt 0 min

entnommenen Proben bilden den Background unspezifischer Bindung. Meßbare Proteinsynthese ohne den Zusatz exogener mRNA wird durch noch im Lysat verbliebene, aktive endogene mRNA induziert.

16.4. Optimierte in vitro Translationsbedingungen

Für poly (A)⁺RNA der Mausspeicheldrüse:

	Endkonz.
0,45µl KAc (2M)	108 mM
0,3 µl MgAc (20mM)	1,6mM
0,2 µl Spermidin (37,5mM)	0,5mM
0,3 µl tRNA _{Kalbsleber} (20mg/ ml)	400 µg/ml
1.5 µl Translationsmix	
5,0 µl ³⁵ S-Methionin (NEN)	50 µCi
5,0 µl Lysat	
12,75µl + 2,25µl poly (A) ⁺	= 15µl pro Ansatz

Für die Translation der mRNA der Glandula vesiculosa des Stieres wird die Kaliumkonz. wegen der nachweislich besseren Translationselongation auf 135mM angehoben.

Der verwendete Translationsmix hat folgende Zusammensetzung:

250 mM	Hepes
400 mM	KCl
100 mM	Kreatinphosphat
500 µM	alle Aminosäuren exklusiv Met

Alle Komponenten sind bei -70°C gelagert. Das Lysat sollte

bei -80°C eingefroren werden.

Die beste Translationseffizienz der mRNA ergab eine Hitzedenaturierung bei 90°C für 90sec. Die in vitro Proteinsynthese wird 2h bei 30°C durchgeführt. Die Synthese wird terminiert durch den Zusatz von $30\mu\text{g/ml}$ Ribonuklease A und $1,2\mu\text{l}$ $0,133\text{M}$ EDTA. Nach einer Inkubationsdauer von 15min bei 30°C können die Produkte im SDS-Gel analysiert werden oder für die Immunpräzipitation verwendet werden.

16.5. Immunologische Analyse in vitro synthetisierter Proteine

Für den immunologischen Nachweis von in vitro synthetisiertem prä-pro-NGF wird der Translationsansatz nach der RNase A Behandlung auf 2.5% SDS und 4% Mercaptoäthanol gebracht. Die Probe wird für 3min gekocht und mit NET Puffer (150mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM Tris/HCl pH 7,4, 1% (w/v) Nonidet P40, 0,02% Natriumazid) entsprechend verdünnt, so daß die SDS Konzentration auf 0,25% absinkt. Das Verhältnis von ionischem zu nichtionischem Detergenz wird auf 1:5 eingestellt, und das Volumen des Ansatzes sollte wenigstens auf das 20 fache zunehmen. Zu den Proben wird jeweils ca. $10\mu\text{l}$ Antiserum zugesetzt und für 4h auf Eis gestellt. Wegen dieser langen Inkubationszeit wird dem Puffer 2mM PMSF, 0,1% (w/v) Aprotinin (Sprinson et al. 1980) und $0,5\text{mM}$ Leupatin zugesetzt. Der Antigen-Antikörper Komplex wird durch die Zugabe von 3mg Protein A-Sepharose in $0,1\text{ml}$ NET an dessen Oberfläche (10°C , 2-3h, Proben sollen rotieren) immobilisiert (Maccecchini et al. 1979). Die Protein A-Sepharose wird 5x mit $0,5\text{ml}$ NET und 1x mit Wasser gewaschen. Die Sepharose wird in $20\mu\text{l}$ Laemmli Probenpuffer aufgenommen, 3min gekocht, und der Überstand wird im SDS-Gel analysiert.

16.6. In vitro Translation hybridselektierter mRNA

Für die Identifikation des primären Translationsproduktes der NGF spezifischen mRNA wird klonierte cDNA^{NGF} auf Nitrozellulose immobilisiert und gegen poly (A)⁺ mRNA der Speicheldrüse hybridisiert. Das folgende Protokoll basiert auf den Arbeiten von Riccardi et al. (1979) und Parnes et al. (1981).

I. Bindung der DNA an Nitrozellulose

Das rekombinierte Plasmid wird mit einer Konzentration von 0,5mg/ml in sterilem Wasser gelöst, 10min gekocht und anschließend im Eis gekühlt. Daraufhin setzt man das gleiche Volumen an 1M NaOH zu und inkubiert die DNA-Lösung 20min bei RT.

Währenddessen werden unter RNase freien Bedingungen kleine NC-Filter (Millipore HAWP) mit 3mm Kantenlänge zurechtgeschnitten.

Nach 20min wird die DNA-Probe durch den Zusatz von 0,5 Volumen des Puffers A (1M NaCl, 0,3M Natriumzitat, 0,5M Tris/HCl pH 8,0 und 1M HCl) neutralisiert. Sofort nach dem Mischen wird die Probe auf Eis gekühlt. Die DNA-Lösung wird nun sukzessiv in Portionen zu 5ul mit Hilfe einer automatischen Mikropipette auf die Filterchen aufgetragen. Nach jedem erneuten Beladungsvorgang werden die Filter im Abzug getrocknet. Nachdem die Filter mit jeweils ca. 3ug Plasmid beladen worden sind, werden sie für 1h an der Luft getrocknet. Die trockenen Filter sollen in sterilen, verschließbaren Röhrchen 2mal mit 50ml 6x SSC bei RT ausgiebig gespült werden. Daraufhin werden sie auf einem Stück sterilen Parafilm ausgebreitet, überschüssige Flüssigkeit wird abgetupft, und die Filter werden nochmals für 1h an der Luft getrocknet.

Durch das Backen der Filterchen in einem sterilen, lose verschlossenen Glasröhrchen für 2h bei 80°C wird die DNA an die Nitrozellulose gebunden. Die Filter können unter Vakuum

beliebig lange gelagert werden.

II. Hybridisierung und Elution gebundener RNA

Jeder mit DNA beladene Filter wird in ein steriles Eppendorfgesäß gesteckt. Zu neuen, bisher unbenutzten Filtern gibt man jeweils 1ml steriles quartzdest. H_2O und kocht die Proben 1min im Wasserbad. Das Wasser wird nach dem Abkühlen der Proben im Eis abgesaugt. Diese Waschprozedur wird ohne Kochen wiederholt, wobei die Probe kräftig geschüttelt werden sollte. Das Wasser wird erneut entfernt. Mit dieser Vorgehensweise sollte sich lose gebundene DNA größtenteils von der Nitrozellulose entfernen lassen. Bereits benutzte Filter werden hingegen wie folgt gewaschen: zu jedem Filter fügt man 1ml 2x SSC in 0,1N NaOH zu. Die Filter werden 30min bei RT inkubiert. Anschließend werden sie 5x hintereinander mit 2x SSC gewaschen und jeweils 10 sec lang kräftig "gevor-text". Zum Schluß werden die Filter noch mit 1ml sterilem H_2O gespült.

Das Volumen der Hybridisierungslösung kann bei der angegebenen Filtergröße auf 25µl begrenzt werden. Ihre Zusammensetzung ist wie folgt:

15µg poly (A)⁺ mRNA Endkonz.: 600µg/ml
65% (v/v) deionisiertes Formamid
20mM steriler Pipes Puffer pH 6,4
0,2% SDS
0,4M NaCl
0,1mg/ml Kalbsleber tRNA (Boehringer)
(0,5U/µl RNasin)

Die Lösung wird 10min auf 70°C erhitzt und zu den einzelnen Filtern zugegeben. Alle Ansätze wurden bei 50°C für 3h inkubiert. Die Hybridisierung wurde über Nacht fortgesetzt, jedoch in einigen Fällen wurde die Temperatur auf 45°C bzw. 37°C gesenkt. Diese Vorgehensweise ist besonders bei mRNAs geringer relativer Häufigkeit ($\leq 0,1\%$) zu empfehlen.

Die Hybridisierungslösung wird nach ca. 15h abgesaugt und durch 1ml Waschpuffer (10mM Tris/HCl pH 7,6, 0,15M NaCl, 1mM EDTA und 0,5% SDS) ersetzt, der auf 65°C vorgeheizt ist und während des Waschvorgangs bei dieser Temperatur gehalten werden sollte. Die Proben werden mehrere Sekunden lang "gevoxt" und der Waschpuffer wird dann durch neuen ersetzt. Diese Waschprozedur wird mindestens 9 mal wiederholt. Die Filter werden nun 2x mit dem gleichen Puffer ohne SDS gespült.

Zur Elution spezifisch gebundener RNA werden die Filter in neue sterile, silikonisierte Eppendorfgläser transferiert, 0,3ml steriles, quartzdestilliertes H₂O und 5,5µg tRNA werden zugegeben, und die Proben werden in ein kochendes Wasserbad für 1min gestellt. Hieraus werden sie sofort in ein Trockeneis/Äthanol-Bad überführt. Nach dem Auftauen wird die RNA durch Zugabe von 33µl 2.5M NaAc pH 5,2 und 0,83ml Äthanol präzipitiert. Die Proben sollten wenigstens für 30min in ein Trockeneis/Äthanol-Bad gebracht werden. Die ausgefallene RNA wird durch Zentrifugation in einer Eppendorfschüttelzentrifuge pelletiert. Das Pellet wird 2x mit 70% Äthanol (-20°C) gewaschen; unmittelbar vor der in vitro Translation wird es getrocknet und in 2µl quartzdest. H₂O resuspendiert.

Die benutzten Filter werden an der Luft getrocknet und bei RT, evtl. sogar unter Vakuum, bis zu ihrer Wiederverwendung gelagert. Für maximale Sensitivität sollten stets frische Filter verwendet werden.

17. Isolierung von cytoplasmatischer RNA und von poly(A)⁺ RNA

Für die Präparation von membrangebundenen Polyribosomen wird nach dem Protokoll von Mac Donald et al. (1977) gearbeitet, wobei jedoch allen Puffern 10mM Vanadylribonukleosidkomplexe als RNaseninhibitor (Berger und Birkenmeier 1979) zugesetzt werden. 5g Gewebe (bovine Glandula vesiculosa) wird in 25ml sterilem, eiskaltem Puffer A (0,3M KCl, 5mM MgCl₂, 0,25M Saccharose, 10mM Natriumiodoacetat, 50mM Tris/HCl pH7,4, 10mM Vanadylribonukleosidkomplexe) homogenisiert. Das Homogenat wird im Hb-4 Rotor bei 12.000g für 10min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird auf einen Saccharose Stufengradienten in Puffer A aufgetragen, der aus jeweils 15ml 1M und 2M Saccharose besteht. Der Gradient wird im Ti 45 bei 43 kUpm 9h lang zentrifugiert. Die Mikrosomenfraktion mit den membrangebundenen Polysomen erscheint als Bande in der Interphase zwischen 1M und 2M Saccharose und wird durch Absaugen geerntet, während die freien Polyribosomen pelletieren. Das Pellet wird in Puffer B (0,3M NaCl, 5mM MgCl₂, 50mM Tris/HCl pH 7,4) resuspendiert und auf eine Konzentration von 100 A₂₆₀ Einheiten pro ml eingestellt. Die Polysomen werden schnell eingefroren und bei -70°C gelagert. Die Mikrosomenfraktion wird in 1/10 Volumen 10% Triton X-100, 10% Desoxycholat solubilisiert und sofort mit Phenol (muß Hydroxychinolin enthalten) zweimal extrahiert. Nach der Chloroformextraktion wird die RNA mit 2,5 Volumen Äthanol (-20°C) für 30-60min bei -20°C gefällt.

Aus RNase reichem Gewebe läßt sich mit Guanidiniumthiocyanat erfolgreich intakte RNA extrahieren. 5-10g Gewebe werden entnommen und in flüssigen Stickstoff eingefroren. Mit einer Reibschale wird das Gewebe zu einem gröberen Pulver zerstoßen und bei RT in 5-10 Volumen Homogenisierungspuffer (5M Guanidiniumthiocyanat, 50mM Tris pH 7,6, 10mM EDTA, 5%

Mercaptoäthanol, 3% Sarcosyl NL 30) mit Hilfe eines Glas-homogenisators weitgehend in Lösung gebracht. Zum Homogenat wird 0,5g/ml CsCl zugegeben und für 5min auf 65°C erhitzt. Im Eis wird wieder auf RT abgekühlt. In Nitrozellulose-Röhrchen (1 x 3,5in) wird ein 5ml Cäsiumchloridkissen (5,7M CsCl, 0,1M EDTA) mit dieser dunkelbraunen Lösung überschichtet und 30h im SW 27 bei 15°C mit max. Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, eventuell wird der Boden des Röhrchens abgeschnitten. Das RNA-Pellet wird in ein steriles, silikonisiertes Corex Röhrchen überführt und in 5-10ml sterilem 10mM Tris/HCl, 4mM EDTA pH 7,4 gelöst. NaCl ist bis zu einer Endkonzentration von 0,1M zu zusetzen. Die gelöste RNA wird mit Phenol/Chloroform (Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol = 24:25:1) extrahiert. Zur Phasentrennung wird die Probe bei 10k Upm für 10min abzentrifugiert. Die wässrige Phase abnehmen und falls erforderlich reextrahieren. Setze 1/10 Volumen 2,5M NaAc pH 5,5 oder 1/10 Volumen 10M LiCl sowie 2,5 Volumen 95% Äthanol zu. Die RNA wird über Nacht bei -20°C oder falls notwendig bei -70°C präzipitiert. Pelletiert wird die RNA durch Zentrifugation bei -10°C, 13k Upm für 10min. Das Pellet wird sorgfältig mit 70% Äthanol gewaschen und erneut abzentrifugiert. Nun wird das Pellet in quartzdest. H₂O (ca. 2ml) aufgenommen. Die Bestimmung der RNA-Ausbeute erfolgt spektralphotometrisch (Rubin 1975). Bei einer Wellenlänge von 260nm entspricht ein OD-Wert von 1 einem RNA Gehalt von 40µg/ml. Verdünne die Lösung auf 20-50 A₂₆₀ Einheiten.

Die Anreicherung der poly (A)⁺ RNA erfolgt durch Affinitätschromatographie über oligo(dT) Zellulose (Aviv und Leder 1972). Oligo (dT) Zellulose wird in RNase freiem Bindungspuffer (20mM Tris/HCl pH 7,6, 0,5M NaCl, 1mM EDTA, 0,05% SDS) äquiliibriert. Man gießt eine Säule mit 1ml Bettvolumen (ausreichend für 10mg RNA) und wäscht das Säulenmaterial mit jeweils 3ml der folgenden Lösungen:

- a) steriles Wasser
- b) 0,1M NaOH, 5mM EDTA
- c) steriles Wasser

Der pH-Wert des Säulendurchflusses sollte jetzt wieder kleiner als 8 sein. Die Säule wird erneut mit 5ml Bindungspuffer äquilibriert. Die gelöste RNA wird für 5min auf 65°C erhitzt; man fügt das gleiche Volumen an doppelt konzentriertem Bindungspuffer zu und kühlt die Probe auf RT ab. Die Säule wird mit diesem Material beschickt. Der Durchfluß wird gesammelt, erneut auf 65°C gebracht, abgekühlt und nochmals über die Säule geschickt. Die Säule wird nun mit 5-10 Säulenvolumen Bindungspuffer und anschließend mit 4 Säulenvolumen intermediären Bindungspuffer (enthält nur noch 0,1M NaCl) gewaschen. Die letzten 4 Fraktionen werden gesammelt, wobei Fraktion 3 und 4 nur noch sehr wenig OD₂₆₀ absorbierendes Material enthalten sollten.

Die gebundene RNA wird mit 2-3 Säulenvolumen Elutionspuffer (10mM Tris pH 7,5, 1mM EDTA, 0,05% SDS) eluiert, der nach Belieben auch auf 60°C gebracht werden kann. Die mRNA wird wie oben gefällt und mit 70% Äthanol gespült. Sie kann im präzipitierten Zustand in 70% Äthanol gelagert werden. Das Pellet wird in Wasser unmittelbar vor Gebrauch resuspendiert.

18. Alkalische Extraktionsmethode für die Isolierung von Vektor-DNA

Für die präparative Aufarbeitung von Vektor-DNA wird 11 Kulturmedium mit einer Übernacht-Vorkultur bis zu OD₆₀₀ = 0,05 angeimpft. Trägt der Vektor einen Resistenzmarker, so wird das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Sobald die

Kultur einen OD-Wert von 0,8-1,0 erreicht hat, setzt man bei amplifizierbaren Plasmiden (z.B. pBR 322 Abkömmlingen) Chloramphenicol zu und inkubiert 18-20h weiter. Die Präparation der Plasmid DNA erfolgt dann nach dem von Birnboim überarbeiteten Protokoll (1983). Jedoch wird die Vektor-DNA nach der LiCl Fällung, zur Abtrennung von RNA und chromosomaler DNA, weiter durch eine isopyknische CsCl-Ultrazentrifugation gereinigt. Das Pellet von 1l Kultur wird in 2ml TE Puffer resuspendiert. Anschließend wird pro ml lg Cäsiumchlorid zugesetzt und ebenfalls in Lösung gebracht. Mit einer CsCl-Vorratslsg. ($\eta = 1,390$) wird auf 12,5ml Endvolumen aufgefüllt, und das Material für 15-30min bei 37°C weiter resuspendiert. Unlösliche Bestandteile werden abzentrifugiert und verworfen. Die Brechzahl der Lösung wird mit einem Refraktometer kontrolliert und falls erforderlich auf $\eta = 1,390$ nachgestellt. Zu 12,2ml DNA Lösung wird 0,8ml der EB Vorratslsg. (10mg/ml) zugesetzt und in ein Beckman Quick-Seal Polyallomer Tube 5/8 x 3 eingeschweißt. Zentrifugiert wird bei 45.000 Upm für 24h bei 20°C. Im Vertikalrotor VTi 50 läßt sich die Laufzeit auf 18h verkürzen. Mit einem 2-Stufen-CsCl-Gradienten (Garger et al.) kann im Ti75 die Laufzeit weiter auf nur 5h bei 65.000 Upm verkürzt werden. Hierzu benötigt man eine CsCl Lösung von 1,470g/ml ($\eta = 1,378$) in TE. 9,5ml dieser Lösung wird in ein 5/8x3 in Zentrifugenröhrchen eingefüllt und mit der DNA haltigen Lösung (2,4ml DNA in TE, 4,2g CsCl und 0,4ml EB der Vorratslsg.) unterschichtet. Die Plasmid-Bande wird durch seitliches Anstechen geerntet und nochmals ultrazentrifugiert. - Das EB wird durch 4-6 maliges Extrahieren mit 1-Butanol (mit Wasser gesättigt) abgetrennt. Das CsCl kann durch Dialyse gegen TE pH 7,5-8 entfernt werden. Zeitsparender ist es, die DNA-Probe mit TE 1:2 zu verdünnen und mit 2 Volumen Äthanol zu präzipitieren. Nach einer Dialyse ist es oft erforderlich, die Probe einzuengen. Am einfachsten geht dies durch Bestreuen des gefüllten Dialyses Schlauches mit Polyäthylenglykol MG > 20.000. Die DNA wird abschließend Phenol/Chloroform extrahiert und nach Zusatz von 1/10 Volumen 2,5M NaAc pH 5,2 mit 2 Volumen

Äthanol bei -20°C gefällt. Die Menge präparierter Vektor-DNA wird spektralphotometrisch ermittelt ($1 A_{260}$ Einheit = $50\mu\text{g}/\text{ml}$). Eine saubere DNA Präparation muß ein Absorptionsverhältnis von $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1,8$ aufweisen.

Für analytische Zwecke läßt sich Plasmid DNA bzw. doppelsträngige M 13 DNA ebenfalls nach Birnboim extrahieren. Für Plasmid DNA werden 5ml Kulturen (YT-Medium plus Antibiotikum) angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für M 13 Phagen muß zunächst JM 103 oder JM 101 auf Minimalplatte (mit Thiamin) ausgestrichen werden. Mit einer Einzelkolonie wird dann eine 100ml Hauptkultur angeimpft und bis $\text{OD}_{600} = 0,5$ inkubiert. Diese Kultur wird in Aliquote à 5ml in 50ml Flacon-Röhrchen umgefüllt und mit jeweils einem Phagen-Plaques beimpft. Diese Minikulturen werden 5-6h bei 37°C kräftig geschüttelt.

In beiden Fällen werden die Kulturen auf Eis gekühlt und bei 4000Upm abzentrifugiert. Das Pellet wird in 0,2ml alkalischem Lysis Puffer I, dem kurz vor Gebrauch $2\text{mg}/\text{ml}$ Lysozym zugesetzt wird, gut suspendiert und für 5-15min auf Eis gestellt. Bei RT wird 0,4ml alk. Lysis Puffer II zugesetzt und nach 5min bei RT für weitere 5min auf Eis gestellt. Die Bakterien sollten jetzt vollständig lysiert sein. Nun wird 0,2ml eiskalter Alk. Lys. III zugefügt, vorsichtig gemischt und für 15min auf Eis gestellt. Die präzipitierte genom. DNA wird durch Zentrifugation bei 4°C in der Eppendorffzentrifuge pelletiert. Die Plasmid-DNA im Überstand wird durch Zugabe von 0,55ml Isopropanol gefällt. Nach 10min bei RT wird die DNA abzentrifugiert und in 0,1ml Acetat/ MOPS Puffer gelöst. Nach der Zugabe von jeweils 0,2ml Äthanol werden die Proben für 15-30min bei -70°C eingestellt und schließlich abzentrifugiert. Das Pellet wird in 0,1ml RNase Puffer (10mM Tris, 1mM EDTA pH 7,5, 150mM NaCl, $0,333\text{mg}/\text{ml}$ RNase A) aufgenommen und für 30-60min bei 37°C inkubiert. Die Proben werden daraufhin mit $50\mu\text{l}$ Phenol behandelt und 1-5min bei RT inkubiert; nach der Phasentrennung wird der wässrige Überstand

mit Chloroform reextrahiert. Zur wässrigen Phase wird nun 1/10 Volumen 2,5M NaAc pH5,3 und 3 Volumen Äthanol zugesetzt und für 30min auf -70°C abgekühlt. Das DNA-Pellet wird sorgfältig mit 70% Äthanol gewaschen, getrocknet und in 20-50ul TE aufgenommen. Die auf diese Weise präparierte DNA ist restringierbar.

19. Präparation von genomischer DNA von Rind und Maus

Bei der unter Pkt.17 beschriebenen RNA-Präparation pelletierte cytoplasmatische RNA in einem Guanidiniumthiocyanat-Cäsiumchlorid Gradienten. Die RNA penetriert hierbei ein CsCl-Kissen, während die genom. DNA darüber schwebt. Nach der Ultrazentrifugation wird 1/3 bis die Hälfte des Gradienten abgesaugt und verworfen. Die visköse genomische DNA wird entnommen und nach einem Vorschlag von Yough et al. (1984) 1:2 mit sterilem Wasser verdünnt. Die Lösung wird vorsichtig durchmischt und mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die Phasen werden durch Zentrifugation 10min bei 10.000Upm getrennt. Die wässrige Phase wird abgenommen und reextrahiert. Nun wird sie mit 2 Volumen kaltem (-20°C) Äthanol überschichtet; die präzipitierte DNA wird durch Aufspulen auf einen dünnen Glasstab isoliert und in TE wieder gelöst. Mitisolierte RNA wird durch Inkubation in 0,1mg/ml vorbehandelte RNase A bei 37°C für 3h verdaut. Verbliebenes Protein wird mit Proteinase K (50µg/ml in 10mM Tris pH 8, 15mM NaCl, 0,1mM EDTA) bei 40°C hydrolysiert und mit Phenol/Chloroform 2x extrahiert. Abschließend wird die DNA gegen 2x 4l TE dialysiert. Die Reinheit der Präparation wird an Hand eines Spektrums zwischen 220-320nm geprüft. Das Material wird bei 4°C gelagert.

20. Radioaktive Markierung von DNA-Proben durch "nick translation"

Der radioaktive Einbau erfolgt modifiziert von New England Nuclear nach Rigby et al. (1977):

50 mM Tris/HCl pH 7,5
6,7mM MgCl₂
5,0mM Mercaptoäthanol
125-250 Einheiten/ml DNA Polymerase I
20µM dNTPs (nicht radioaktiv)
10µg/ml DNA
0,1 Einheiten/ml DNase I

in einem Gesamtvolumen von 20µl bei 15°C, 60-90min

Das ³²P markierte Desoxynukleotid sollte mit einer Endkonz. von 8µM im Ansatz vorliegen. Die Reaktion wird mit 1/10 Volumen 0,5M EDTA gestoppt. Bisweilen ist auf die DNase verzichtet worden. In diesem Fall wurde 3-5h oder sogar über Nacht inkubiert. Nicht eingebautes ³²P-dATP (≥ 2000Ci/mmol) wird über Sephadex G50 bzw. 75 (Säulenpuffer 10mM Tris pH 7,5-7,7, 10mM NaCl, 2mM EDTA) von der markierten DNA abgetrennt. Fraktionen, die markierte DNA enthalten, werden vereint und bei -20°C gelagert.

21. Reinigung von Desoxyoligonukleotiden und 5'Endmarkierung

A) Abspaltung der Basenschutzgruppen

Mit ammoniakalischer Lösung wird das fertig synthetisierte Oligonukleotid vom Kieselgelträger abgespalten und weitere 5h bei 60°C inkubiert. Die Probe wird eingefroren und mit einer "speed-vac" lyophilisiert. Der Rückstand wird in 0,5ml H₂O aufgenommen, gemischt und nochmals lyophilisiert.

B) Abspaltung der Dimethoxytritylgruppe am 5'Ende des Oligonukleotids

Der Rückstand wird in 2ml Essigsäure:Wasser = 4:1 (p:p) aufgenommen und 15min bei RT inkubiert. Von Zeit zu Zeit die Probe vortexen. Die 15min sollten nicht überschritten werden, da die Gefahr einer Depurinisierung besteht. Die Probe in Stickstoff einfrieren und lyophilisieren.

C) Ätherextraktion

Der Rückstand wird in 0,5ml NH₄Ac pH 5,4 aufgenommen und 5x mit 1ml Diäthyläther extrahiert. Die letzten Ätherreste werden durch kurzes Lyophilisieren entfernt. Feste Bestandteile werden durch einen kleinen Millipore Filter (Millex HV oder HV4, 0,45µm Porengröße) abgetrennt. Mit 0,5ml Wasser wird nachgespült; die Eluate werden vereint und lyophilisiert.

D) Reinigung des Oligonukleotids über ein Polyacrylamidgel

Das Lyophilisat wird in ca. 50µl 90% Formamid, 0,6mM EDTA, 25mM Tris-Borat pH 8,5 mit sehr wenig Xylencyanol und Brom-

phenolblau aufgenommen und in einem 20% Polyacrylamid 8M Harnstoff Gel (Dicke 1,5mm) aufgetrennt. Durch UV-Shadowing ($\lambda = 254\text{nm}$) wird die Position des Oligonukleotids sichtbar gemacht und aus dem Gel herausgeschnitten. Das Gel wird durch eine 5ml Einwegspritze gepreßt u. in einem 2ml Eppendorfgefäß aufgefangen. Das so zerkleinerte Gel wird für >12h in 2-3 Volumen H_2O aufgenommen. Der Überstand wird abgenommen, und das Gel wird wenigstens noch ein weiteres Mal mit 1ml Wasser für 6-8h reextrahiert. Durch Sterilfiltrieren (siehe oben) werden die vereinten Überstände von unlöslichen Partikeln befreit. Die Probe wird 1x mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Die wässrige Phase wird mit Äther reextrahiert und an der "speed-vac" durch Lyophilisieren weitgehend eingengt. Nach Zusatz von 1M LiCl u. 10mM MgCl_2 wird das Oligonukleotid mit 3-10 Volumen Äthanol bei -70°C für mehrere Stunden gefällt. Nach dem Abzentrifugieren wird das Präzipitat 2x mit 0,5ml 70% Äthanol (-20°C) und 1x mit 95% Äthanol gewaschen. Kurze Oligonukleotide sollten vorzugsweise nach der Elution aus dem Gel mit einer DEAE-Sephadex Chromatographie gereinigt werden. Diese Möglichkeit ist auch alternativ für das 18mer Oligonukleotid beschrieben worden (siehe z.B. EMBO J.3, 801 1984).

5'Endmarkierung mit γ - ^{32}P ATP

Die Reaktion wird unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

50mM Tris/HCl pH 7,6
10mM MgCl_2
5mM DTT
1mM Spermidin
1mM EDTA
ca. 10pmol 5' Enden
≥ 35pmol γ - ^{32}P -ATP
10 Einheiten T 4 Polynukleotidkinase
in einem Gesamtansatz von 50µl

Der Ansatz wird bei 37°C ca. 30min inkubiert und mit 2µl 0,5M EDTA gestoppt. Nicheingebautes (α -³²P) ATP wird durch Chromatographie über Sephadex G25 in 10mM Tris pH 7,7, 10mM NaCl, 2mM EDTA abgetrennt.

22. Einzelsträngige ³²P markierte RNA-Hybridisierungsprobe

Das PstI Insert von pMN (siehe Anhang A-1) wurde in die Polylinker Region des Plasmids SP64 umkloniert. Der stromaufwärts gelegene SP6 Promoter ermöglicht die in vitro Synthese einer ³²P markierten RNA-Hybridisierungsprobe (die Reaktionsbedingungen sind bei Heumann et al. 1984 beschrieben).

23. Restriktionsverdau, Elektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen

Für analytische Zwecke wird DNA in 20µl Restriktionsansätzen bei 37°C geschnitten. Die Reaktionsbedingungen entsprechen den Angaben der Hersteller. Eco RI- und Hind III-Schnitte wurden gleichzeitig in "Medium"-Puffer (50mM NaCl, 10mM Tris/HCl pH 7,5, 10mM MgCl₂, 1mM DTT) durchgeführt. Die Reaktionen werden mit 20mM EDTA gestoppt und entweder direkt zusammen mit 1/6 Volumen Probenpuffer (0,25% Bromphenolblau, 30% Glycerin) oder erst nach einer Äthanolpräzipitation elektrophoretisch in 1-1,5% Agarosegelen analysiert. Der verwendete Laufpuffer ist TBE (90mM Tris, 90mM Borsäure pH 8,3, 4mM EDTA). Für die präparativen Restriktionen haben

sich folgende Bedingungen bewährt: DNA 0,5µg/ml; Enzymmenge 0,6U/µg. Die gleiche Menge Enzym wird nach mehreren Stunden ein zweites Mal zugesetzt; der Verdau kann über Nacht fortgesetzt werden. Nach Boehringer Mannheim können DNA-Fragmente bereits im Restriktionspuffer dephosphoryliert werden. Zum Ansatz werden 6-8U alkalische Phosphatase (Kalb) zugesetzt und 20min bei 37°C weiter inkubiert. Die Reaktion wird gestoppt durch Erhitzen auf 65°C für 10min in Gegenwart von 20mM EGTA. Die DNA wird phenolextrahiert u. präzipitiert. Die wieder in Lösung gebrachte DNA kann endmarkiert werden.

Zum Nachschneiden und zur radioaktiven Markierung werden gewünschte DNA Fragmente aus Agarosegelen herausgeschnitten und nach Mc Donnell et al. (1977) in 0,5x TBE-Puffer elektroeluiert, phenolextrahiert und präzipitiert. Die zusätzliche Reinigung über einen DEAE-Ionenaustauscher ist möglich (Schleicher & Schüll Protokoll 205), aber bei guter Qualität der Agarose nicht notwendig.

24. Transfer von DNA aus Agarosegelen auf Nitrozellulose und Hybridisierung mit radioaktiven NGF spezifischen Proben

Der Transfer erfolgt nach der Methode von Southern et al. (1975). Das mit EB angefärbte und photographierte Gel wird zur Denaturierung der DNA bei RT 2x 15min geschüttelt, 20min bei 4°C neutralisiert und zuletzt 20min in 20x SSC äquilibriert. Das Gel wird auf zwei Lagen Whatman 3MM Papier (in 20x SSC getränkt) gelegt und mit Nitrozellulose (vorher mit 2x SSC befeuchtet) bedeckt; auf das Filter wird 3MM Papier und mehrere Lagen Zellstoff gelegt. Das Ganze wird mit einem

Gewicht beschwert. In den ersten 90min wird der Zellstoff öfters gewechselt; der Transfer wird dann über Nacht bei RT oder im Kühlraum fortgesetzt. Anschließend wird die Nitrozellulose kurz in 2x SSC gespült, zwischen 3MM Papier an der Luft getrocknet und 2h bei 80°C gebacken.

Für die Hybridisierung wird das gebackene Filter zunächst in Zx SSC angefeuchtet (Z steht für das gewählte Vielfache der Salzkonz. von SSC) und in Haushaltsfolie eingeschweißt. Es wird für 0,5-2h in Vorhybridisierungspuffer bei der gewählten Hybridisierungstemp. inkubiert. Der Puffer hat folgende Zusammensetzung:

Zx SSC, 0,5% SDS, 5x Denhardt's Lsg., 50-100µg/ml Träger-DNA (Ultraschall behandelt und 5-10min vor Gebrauch gekocht).

Die Hybridisierungslösung wird ausgetauscht; das Volumen der Lösung sollte ca. 50µl/cm² betragen. Die radioaktive Probe wird 5min aufgeköcht, in Eis gekühlt und zugegeben. Bei den genomischen Blots wurden die Filter fast 24h hybridisiert, für klonierte Fragmente dient 5h als Richtwert. Unspezifisch gebundene Radioaktivität wird von den Filtern mit Waschpuffern bei steigender Temperatur und abnehmender Ionenstärke entfernt (2x SSC, 0,5% SDS; 0,1x SSC, 0,5% SDS).

Hybridisierungsbedingungen für den genomischen Blot: Der T_m oder die Schmelztemperatur eines Hybrids wird durch folgende Formel abgeschätzt:

$$T_m = 16,6 \lg Na^+ + 0,41 (\% G+C) + 81,5 - 0,65 (\% \text{Formamid}) - 500/bp$$

Na^+ in mol/l

Gültigkeitsbereich: $0,02 M \leq Na^+ \leq 0,5 M$

1% Basenfehlpaarung senkt den T_m um $1,5^\circ C$

bp := Länge der Duplex-DNA

Mit dieser Formel ließ sich bei einer angenommenen Fehlpaarung zwischen Maus und Rind von 14% und bei einer Salzkonzentration von 3x SSC für das Hybridmolekül ein T_m von $76^\circ C$ voraussagen. Deshalb wurde mit einer Hybridisierungstemperatur von $50^\circ C$ gearbeitet.

Hybridisierungsbedingungen mit dem 5'endmarkierten Oligonukleotid NGF 1:

50% Formamid, 5x Denhardt's Lsg., 5x SSC, 0,1% SDS,

100 µg/ml E. coli DNA

Hybridisierungstemp. $t = 10^\circ C$

Waschung: 2x SSC, 15min bei $50^\circ C$

Nach Suggs et al. (1981) läßt sich der scheinbare Schmelzpkt. eines Oligonukleotids ermitteln aus der Zahl der dA:dT Nukleotidpaare, die den T_m um jeweils $2^\circ C$ erhöhen und der Zahl der dG:dC Paare, die mit jeweils $4^\circ C$ in Rechnung gesetzt werden können.

25. Transfer von glyoxylierter RNA auf Nitrozellulose und Hybridisierung mit einer ss ^{32}P markierten RNA-Probe

Die Elektrophorese glyoxylierter RNA sowie der Transfer auf Nitrozellulose werden unverändert nach Thomas (1980) durchgeführt. Die Hybridisierung mit der ^{32}P -RNA^{NGF} Probe erfolgt nach Heumann et al. (1984).

26. Dot-Blot Tests für RNA und DNA

Nitrozellulose (BA 85, Schleicher&Schüll) wird mit Wasser angefeuchtet und in 20x SSC überführt. Das Filter wird nun in der Minifold Absauganlage (S+S) zusammen mit einem dicken Filterpapier passender Größe eingelegt.

Die RNA wird in ca. 0,1ml 10x SSC aufgenommen; t-RNA kann als Träger (0,1-0,5µg) zugesetzt werden. Die RNA- Proben werden langsam abgesaugt, und jede Bohrung wird mit 0,1ml 10x SSC nachgespült. Die Empfindlichkeit dieser Methode ist in erster Linie von der spezif. Radioaktivität der Hybridisierungsprobe abhängig. Mit "nicktranslatierten" radioaktiven Proben von 10^6 - 10^8 cpm/µg erreicht man Empfindlichkeiten zwischen 1-100pg spezifischer RNA.

Arbeitet man mit DNA, so kann man ebenfalls Träger-DNA zusetzen und kocht dann die Probe für 5-10min auf. Nach dem Abkühlen im Eis setzt man 1 Volumen 1M NaOH zu und inkubiert bei RT für 20min. Die Probe wird neutralisiert durch 0,5 Volumen 1M NaCl, 0,3M Na-Zitrat, 0,5M Tris pH 8 und 1M HCl. Nach kräftigem Durchmischen wird die DNA-Probe gekühlt und schließlich abgesaugt. Nachgespült wird mit 6x SSC.

Die Filter mit adsorbierter DNA bzw. RNA werden an der Luft getrocknet und bei 80°C für 2h gebacken. Für "nicktranslatierte" DNA-Hybridisierungsproben wurden für die Vor- bzw.

Haupthybridisierung die folgenden Bedingungen gewählt:

50% Formamid, 5x Denhardt's Lsg., 5x SSC, 0,1% SDS,
100 µg/ml denaturierte Träger-DNA

Hybridisiert wurde bei 30-40°C; die Vorhybridisierung dauerte 1h; die Haupthybridisierung geschah über Nacht. Die Filter wurden 20 min bei 50°C in 0,1x SSC gewaschen.

27. Synthese doppelsträngiger cDNA

Erststrangsynthese

Zwischen 5-20µg poly (A)⁺ RNA werden wie folgt denaturiert:

15µl (=15µg) mRNA

1,9µl 50mM CH₃HgOH

Der Ansatz wird 5min bei RT inkubiert, dann wird 30µl AMV reverser Transkriptase-Mix zugesetzt, gut gemischt und nochmals 5min bei RT inkubiert.

Daraufhin werden 20µCi ³²P-dATP zugefügt, und die Reaktion in einem Endvolumen von 50µl mit ca. 30units reverser Transkriptase gestartet. Nach 30min bei 37°C wird folgendes zugesetzt:

0,5µl 2,5mM DTT

3x 12,5 µl 2,5mM dNTP

5 µl 2,5mM dATP

0,5 µl 2,0mM MgAc

4,6 µl H₂O

2,0 µl reverse Transkriptase (ca.30 Einheiten)

Die Reaktion wird nun bei 42°C für mindestens 60min fortgesetzt (von DeGennaro,unpubliziert); abgestoppt wird schließ-

lich mit 20mM EDTA. An Hand der TCA präzipitierbaren Radioaktivität kann die Menge synthetisierter cDNA abgeschätzt werden. Die RNA wird alkalisch hydrolysiert mit 250mM NaOH bei 67°C für 1h. Nach der Neutralisation mit der gleichen Menge HCl und 80ul 1M Tris/HCl pH 8 wird die Probe mit Phenol/Chloroform extrahiert, und nicht eingebaute Radioaktivität wird durch Gelfiltration (Sephadex G100) abgetrennt. Die synthetisierte cDNA wird mit Äthanol präzipitiert. Die Länge der Transkripte wird mittels einer alkalischen Gelelektrophorese abgeschätzt. Ein 1,4%-iges Agarosegel wird in 50mM NaCl, 1mM EDTA gegossen. Nachdem das Gel erstarrt ist, wird es für wenigstens 30min vor dem Auftragen der Proben in alkalischem Elektrophoresepuffer (30mM NaOH, 1mM EDTA) äquilibriert. Der Probenpuffer hat folgende Zusammensetzung: 50mM NaOH, 1mM EDTA, 2,5% Ficoll (Typ 400 Pharmacia) und 0,025% Bromphenolgrün. Die Elektrophorese kann bei 7,5V/cm durchgeführt werden. Nach Beendigung des Laufs wird das Gel zwischen vielen Lagen 3MM Papier, die beschwert werden, getrocknet und anschließend autoradiographiert. Ca. 20.000 cpm sollten auf das Gel pro Spur aufgetragen werden.

Zweitstrangsynthese

Der 1.Strang der cDNA wird durch Zentrifugation (10min) pelletiert. Die DNA wird in 50ul H₂O resuspendiert. 50ul Klenow Puffer werden zugesetzt, es wird gemischt, und ca. 40.000 cpm werden für spätere Gelelektrophoresen abpipettiert. Die Reaktion wird mit 20 Einheiten Klenow-Enzym pro µg eingesetzter cDNA gestartet. Inkubiert wird 20h bei 15°C. Die Reaktion wird mit 2,0ul 0,5M EDTA gestoppt. 40.000cpm werden für die gelelektrophoretische Analyse entnommen. Der Rest der Probe wird Phenol/Chloroform extrahiert und über Sephadex G50 gegeben. Fraktionen mit radioaktiver ds cDNA werden vereint und mit Alkohol gefällt.

Um die Ausbeute ds cDNA zu verbessern, wird dieselbe Reaktion nochmals mit reverser Transkriptase wiederholt. Der in

20µl Wasser aufgenommenen cDNA wird zugesetzt:

1M Tris/HCl pH 8,3	5	µl
1M KCl	7	µl
250mM MgCl ₂	2	µl
alle dNTPs 20mM	2,5	µl
700mM 2-Mercaptoäthanol	2	µl
H ₂ O	48	µl
reverse Transkriptase (AMV)	2	µl

Die Reaktion (Maniatis et al. 1982) wird mit 2µl 0,5M EDTA gestoppt. 40.000cpm werden wiederum für gelelektrophoretische Zwecke entnommen. Der Rest wird Phenol/Chloroform extrahiert, über Sephadex G50 chromatographiert und Äthanol präzipitiert. In einem alkalischen Agarosegel wird folgendes cDNA-Material (jeweils 20.000cpm) aufgetragen: ss cDNA, ds cDNA nach Klenow- und nach reverser Transkriptase Behandlung.

28. Behandlung der cDNA mit S1 Nuklease und Größenfraktionierung über Sepharose CL 4B

Die Ausbildung der doppelsträngigen "Hairpin" Struktur und die Spezifität der S1-Nuklease kann nach Goodman et al. (1979) folgendermaßen überprüft werden:

- a) 5000cpm ds cDNA werden in 1ml S1 Puffer (30mM NaAc pH 4,5, 0,3M NaCl, 3mM ZnCl₂, 10µg/ml denaturierte Kalbsthymus DNA) überführt. Die Probe wird in zwei Aliquote à 0,5ml aufgeteilt. Zu einem Röhrchen werden 300 Einheiten S1-Enzym zugesetzt. Beide Röhrchen werden bei 37°C 60min

inkubiert, TCA präzipitiert und ausgezählt. 70% der eingesetzten Radioaktivität sollte SI resistent sein.

- b) 5000cpm ds cDNA werden in 1ml SI Puffer aufgenommen, für 3min auf 100°C erhitzt und in Eis gekühlt. Eine Hälfte der Probe wird erneut mit 300 Einheiten SI versetzt und wie unter a) weiterbehandelt. Liegt ein großer Anteil des eingesetzten Materials in "Hairpin" Struktur vor, so sollte 50-60% des eingesetzten Materials SI beständig sein.
- c) Zunächst wird wie bei a) verfahren. Nach 1h SI-Verdau bei 37°C werden beide Röhrchen auf 96°C für 3min erhitzt. Zum gleichen Röhrchen wird ein zweites Mal Enzym zugesetzt und 60min bei 37°C inkubiert. Nach dieser zweiten SI-Behandlung sollten nur mehr ca. 10% der eingesetzten Radioaktivität TCA präzipitierbar sein.

Der präparative SI Nuklease Verdau doppelsträngiger cDNA wird nach den gleichen Autoren folgendermaßen durchgeführt: zu 1µg ds cDNA in 0,17ml H₂O wird 20µl 10x SI Puffer (0,3M NaAc pH 4,5, 3M NaCl, 45mM ZnCl₂) und 240 Einheiten Enzym in 10µl (1200U/ml) zugegeben; nach 30min bei 22°C wird die Probe noch 5min auf 3-4°C abgekühlt. Daraufhin wird das Ausmaß des Verdaus mit einem alkalischen Agarosegel kontrolliert, währenddessen die Probe bei -70°C gelagert wird. Endgültig terminiert wird die Reaktion mit 1/10 Volumen 1M Tris/HCl pH 9 und 1/8 Volumen 0,2M EDTA. Nach der Alkoholfällung wird die cDNA in 18µl TE (pH 8) aufgenommen und mit 2µl 3M NaAc versetzt. Das Material wird in ungefähr 6 Größenklassen à 50µl mittels einer 1ml Sepharose CL 4B Säule fraktioniert. Als Laufmittel dient 10mM Tris/HCl pH 8, 0,3M NaCl und 1mM EDTA. Aliquote der einzelnen Fraktionen werden im alkalischen Agarosegel auf ihre Größe hin untersucht. Fraktionen mit cDNA Molekülen größer als 400bp Länge werden

zusammengefaßt und mit Alkohol präzipitiert.

29. Addition von dCs an doppelsträngige cDNA

Für diese Reaktionen werden die von Michelson und Orkin (1982) beschriebenen Bedingungen herangezogen:

Konzentration der 3'Enden:	28,8 nM
Natriumcacodylat pH 7,2	120 mM
DTT	0,1 mM
dCTP 80µCi/nmol	5,0 µM
BSA	0,5 mg/ml
CoCl ₂	1,0 mM
Terminale Transferase (Firma PL)	640 U/ml

Die Synthese wird bei 20°C durch den Zusatz des Enzyms gestartet und nach 20min durch EDTA (Endkonz. 20mM) gestoppt. Laut der Autoren führen diese Bedingungen zu gut klonierbarer cDNA. Verwendet man Tritium für die Markierung, so kann man den radioaktiven Einbau in die ³²P markierte DNA gut verfolgen.

Die biologische Aktivität der terminalen Transferase läßt sich mit PstI linearisiertem pUC9 in folgendem Ansatz überprüfen:

³ H dCTP (1 Ci/mmol)	10 µCi
Tailing Puffer	12,5 µl
BSA 5mg/ml	2,5 µl
pUC9	0,65ug
CoCl ₂ 10mM	2,5 µl
kräftig vortexen	
Ges.volumen inklusiv Enzym	25 µl

Die Reaktion wird mit 16 Einheiten Enzym bei 12°C gestartet, und 3ul Aliquote werden zeitabhängig bei 0; 1; 2,5; 5; 10; 20 min entnommen und mit TCA präzipitiert.

30. Insertion von cDNA in pBR322 durch nicht-kovalente Verknüpfung über dG/dC Basenpaarung

Äquimolare Mengen an cDNA mit einem oligo(dC) Schwanz und oligo(dG) tragende Vektor-DNA (pBR322 wurde hierzu mit PstI restringiert) werden in Annealing Puffer (0,1M NaCl, 10mM Tris/HCl pH 7,8, 1,0mM EDTA) mit einer Endkonzentration von 1µg/ml vereint und für 5min auf 65°C erhitzt. Die Mischung wird dann 2h konstant bei 43°C gehalten und anschließend innerhalb der folgenden 2h auf RT abgekühlt. Die chimären Plasmide werden bei 4°C gelagert.

31. Transformationsprotokolle für E.coli mit Plasmid DNA

a) Transformation durch CaCl_2 (Mandel und Higa 1970)

100ml Medium werden mit einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer Dichte von 5×10^7 Zellen/ml (recA^- : 0,5OD₆₀₀; recA^+ : 0,2-0,3OD₆₀₀) bebrütet. Die Kultur wird auf Eis gekühlt und bei 4000g, 4°C 10min lang abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Die Zellen werden in eiskalten, sterilen Transformationspuffer (50mM CaCl_2 , 10mM Tris/HCl pH 8.0) im halben ursprünglichen Volumen resuspendiert. Die

Zellsuspension wird für 15min auf Eis gestellt und dann erneut bei 4000g, 4°C abzentrifugiert. Die Bakterienzellen werden nun in 1/15 des ursprünglichen Volumens aufgenommen, und in 0,2ml Portionen aufgeteilt. Die Proben werden für 12-24h im Transformationspuffer gelagert (Dagert und Ehrlich 1979). Die DNA (max. 40ng in 0,1ml) wird zugesetzt und der Ansatz wird nach dem Mischen für 30min auf Eis gestellt. Die Proben werden daraufhin für 2min auf 42°C erhitzt. Zu jedem Ansatz wird 1ml Vollmedium zugesetzt und die Zellen werden bei 37°C ohne Schütteln für 1h inkubiert. Zum Schluß werden die Transformanten ausplattiert und bei 37°C bebrütet. Die Kolonien erscheinen nach ca. 16h.

b) Transformation durch CaCl_2 , KCl und MgCl_2 (De Gennaro et al. unpubliziert)

Bakterien wie oben auf 5×10^7 Zellen/ml hochwachsen lassen. Die Zellen pelletieren und im selben Volumen Waschpuffer (0,1M NaCl, 5mM MgCl_2 , 5mM Tris/HCl pH 7,2) aufnehmen. Sie werden wiederum pelletiert und in 1/3 Volumen Waschpuffer resuspendiert. Daraufhin werden die Zellen erneut abzentrifugiert, in 1/10 Volumen Ca^{++} -Puffer (75mM CaCl_2 , 0,25M KCl, 50mM MgCl_2 , 50mM Tris/ HCl pH 7,2) aufgenommen und für 20min auf Eis gestellt. Die Zellen werden ein letztes Mal pelletiert und in 1/20 Volumen Ca^{++} aufgenommen. Die Zellsuspension wird in 0,2ml Aliquote aufgeteilt. Die Zugabe der DNA etc. erfolgt wie bei der ersten Prozedur.

c) Transformation durch CaCl_2 , RbCl_2 , DMSO und DTT (Hanahan 1983)

Eine Bakterienkultur wird in SOB-Medium bis zur Zelldichte $4-7 \times 10^7$ Keime/ml angezüchtet. Die Kultur wird geerntet, und die Zellen werden in 1/3 Volumen Transformationspuffer (TFB) resuspendiert. Die Bakterien kommen für 10-15min auf Eis und

werden dann abzentrifugiert. Das Pellet wird in 1/12.5 des ursprünglichen Volumens in eiskalten TFB aufgenommen und in 0,2ml Portionen aufgeteilt. Frisches DMSO wird mit einer Endkonzentration von 3,5% (7ul pro 0,2ml Probe) zugesetzt. Nach dem Mischen wird der Ansatz für 5min auf Eis gestellt. Nun wird 75mM DTT (Endkonz.) beigelegt (7ul der DTT-Vorratslösung). Nach dem Mischen kommt die Probe erneut 10min auf Eis. Daraufhin gibt man nochmals die gleiche Menge DMSO zu und inkubiert 5min auf Eis. Dieser Zeitplan muß genau eingehalten werden (eigene Beobachtung und persönliche Mitteilung R.Heumann). Nun setzt man zum Transformationsansatz 10pg-lng DNA in einem Volumen $\leq 10\mu\text{l}$ zu und stellt ihn für 30min auf Eis. Der Ansatz wird 60sec auf 42°C erhitzt, 1-2min in Eis gestellt und mit SOC-Medium (20°C) auf 1ml verdünnt. Die Bakterien werden vor dem Ausplattieren noch 1h bei 37°C inkubiert.

Sobald mehr als 10% des Ansatzes auf eine Platte ausgestrichen wird, müssen die Zellen abzentrifugiert und lx mit 1ml SOB Medium gewaschen werden.

TFB	100mM RbCl
	45mM MnCl_2
	10mM CaCl_2
	10mM Kalium-2N-Morpholinoäthansulfonsäure (1M Vorratslsg. mit KOH einstellen, sterilfiltrieren und bei -20°C lagern)
	3mM Hexamminkobalt(III)chlorid

Puffer sterilfiltrieren.

DMSO: sollte größtem Reinheitsgrad entsprechen; mit Stickstoff überschichten und bei -70°C einfrieren.

DTT: 2,25M in 40mM KAc pH 6,0 lösen u. sterilfil-

trieren bei -70°C oder tiefer aliquotiert lagern.

3)

Dieses Protokoll ist modifiziert worden, indem die Zellen in 1/12,5 des ursprünglichen Volumens in TFB 20h auf Eis gestellt wurden. Nach dieser Zeit wird 2x entsprechend dem Zeitplan von Hanahan DMSO beigefügt. Auf die Zugabe von DTT wird völlig verzichtet. Seine stimulierende Wirkung auf die Transformationsrate bedarf einer ständigen Kontrolle, will man eine gleichbleibend hohe Effizienz erzielen. Die vorgeschlagene Modifikation scheint den DTT-Schritt vollständig ersetzen zu können und erweist sich als unproblematisch.

32. Koloniehybridisierung (nach Grunstein et al. 1979)

- a) **Transfer der Transformanten von Agar auf Nitrozellulose:**
Sobald die ausplattierten Bakterienkolonien eine Größe von 0,1-0,5mm erreicht haben, wird auf die bewachsene Agarplatte ein steriles NC-Filter aufgelegt und nach kurzer Verweildauer wieder abgezogen. Die Mutterplatte und das Masterfilter, das auf eine luftgetrocknete Antibiotikumplatte aufgelegt wird, werden bei 37°C bebrütet. Nach dem Anwachsen der Klone auf dem Masterfilter können von diesem Replika durch Abdrücken der Kolonien auf einen neuen, angefeuchteten Filter hergestellt werden. Die Mutterplatte und das Masterfilter werden bei 4°C zwischengelagert, während die Replikafilter auf ihre Antibiotikumpplatten aufgelegt und bei 37°C bebrütet werden, bis die Kolonien eine Größe von 1-2mm erreicht haben. Nun werden die Filter zur Amplifikation der Plasmide auf Chloramphenicolplatten (100µg/ml) übertragen und 12h weiter inkubi-

biert.

- b) **Lyse der Bakterien und Hybridisierung mit einer radioaktiven Probe:** Die mit Kugelschreiber beschrifteten und in ihrer Orientierung markierten Filter werden auf 3MM Papier aufgelegt, die mit folgenden Lösungen gut durchtränkt sind:

0,5M NaOH	7 min
1,0M Tris pH 7,5	2 min
1,0M Tris pH 7,5	2 min
1,5M NaCl, 0,5M Tris pH 7,5	4 min

Die Filter werden nach dieser Behandlung bei RT auf 3MM Papier ausgelegt und getrocknet. Sie werden mit vorbehandelter Pronase (bis 400µg/ml) oder mit Proteinase K (10µg/ml) in 1xSSC bei 40°C für 1h inkubiert. Daraufhin werden die Filter in 1xSSC gespült, kurz in Äthanol getaucht und für 0,5-1h in Chloroform überführt. Nach dem Trocknen werden sie in 0,3M NaCl gebadet, auf Filterpapier getrocknet und für 2h bei 80°C gebacken.

Die gebackenen Filter werden in 6xSSC gegeben und nach 5 min in die Vorwaschlösung (50mM Tris/HCl pH 8, 1M NaCl, 1mM EDTA, 0,1% SDS) für 1-2h bei 35°C überführt. Die angegebene Temperatur richtet sich nach der späteren Hybridisierungstemperatur. Die Filter werden in Plastikfolie eingeschweißt und mit der Hybridisierungslösung für 1-6h vorinkubiert. Die Lösung wurde gegen neue ausgetauscht, und jeder Filter wurde mit 400.000-600.000cpm einer monospezifischen radioaktiven Probe überschichtet. Die genauen Bedingungen für die Hybridisierung und Waschung sind unter Pkt. 26 beschrieben.

33. Dephosphorylierung von 5'Enden

DNA max. 25 pmol	5'Enden
10x CIP-Puffer	5,0µl
dd H ₂ O	ad 48,0µl

Man setzt zwischen 0,01-0,1 Einheiten alkalische Phosphatase pro pmol 5'Enden zu.

Für die Dephosphorylierung von überstehenden 5'Enden inkubiert man den Ansatz für 30min bei 37°C. Daraufhin fügt man nochmals die gleiche Menge Enzym zu und setzt die Inkubation für weitere 30min fort. Das Enzym wird durch Erhitzen auf 68°C in Gegenwart von 20mM EGTA inaktiviert. Die Probe wird 1x mit Phenol und 1x mit Chloroform extrahiert und mit Alkohol präzipitiert. Die DNA kann nun für Ligation oder Kinasierung verwendet werden. Die 5'Endmarkierung ist auf Seite 44 beschrieben.

10x CIP-Puffer :	0,5M Tris/HCl pH 9
	10mM MgCl ₂
	1mM ZnCl ₂
	10mM Spermidin

34. 3'Endmarkierung von Restriktionsfragmenten mit α -³²P Cordycepin

Die Restriktionsfragmente werden aus der Agarose elektroeluiert. Nach der Entfernung von Agaroseresten wird die DNA mit Phenol behandelt und präzipitiert. Nach der Wiederaufnahme in H₂O oder TE kann sie 3'endmarkiert werden:

5-25pmol 3'Enden

5min auf 68°C erhitzen und in Eis stellen

2x"Tailing" Puffer 25 µl

BSA 5mg/ml 5 µl

3' dATP (Cordycepin) 100-300 µCi (2-3facher Überschuß)

dd H₂O ad 43 µl

CoCl₂ 10mM 5 µl

terminale Transferase 2 µl

Die Reaktion wird 45min bei 37°C inkubiert und mit 20mM EDTA gestoppt. Nicht eingebaute Radioaktivität wird über Sephadex G50 abgetrennt. Fraktionen, die markiertes Fragment enthalten, werden vereint und mit Alkohol präzipitiert.

35. Chemisches Sequenzieren nach Maxam und Gilbert

Bei dieser Sequenzierungsmethode kommt es darauf an, daß lineare DNA-Moleküle nur an einem Ende eine radioaktive Markierung tragen. Nur so ist später ein eindeutiges Ablesen der Sequenz möglich. Nach der radioaktiven Endmarkierung müssen deshalb durch Restriktion die markierten Enden voneinander getrennt werden. In dieser Arbeit ist vorwiegend nach folgendem Prinzip vorgegangen worden: das rekombinierte Plasmid pUC9 ist mit einem Restriktionsenzym der Polylinker-region oder einem im Insert singular schneidenden Enzym linearisiert worden. Nach einer 5'- oder 3' Endmarkierung ist das lineare Plasmid so nachgeschnitten worden, daß entweder das gesamte Insert, also die klonierte DNA, oder ein Teil davon als markiertes Fragment abgetrennt wurde. Durch präparative Gelelektrophorese konnte dieses einseitig markierte Molekül isoliert und den chemischen Reaktionen zugeführt werden:

G	A+G	T+C	G
Modifikation	Modifikation	Modifikation	Modifikation
200ul Puffer	10ul Wasser	10ul Wasser	15ul 5% NaCl
5ul 32 P DNA	10ul 32 P DNA	10ul 32 P DNA	5ul 32 P DNA
1ul DMS	2ul Pip. For. pH=2	30ul Hydrazine	30ul Hydrazin
206ul	22ul	50ul	50ul
20°C, 6min	37°C, 30min	20°C, 5min	verfahre wie
50ul Stop	einfrieren	200ul Hydrazin Stop	bei T+C
750ul Äthanol	lyophilisieren	750ul Äthanol	
15min bei -20°C		verfahre wie bei G	
zentrifugieren	100ul Wasser		
Pellet	lyophilisieren		
250ul 0,3M NaAc			
750ul Äthanol			
15min bei -20°C			
zentrifugieren			
Pellet			
mit Äthanol spülen			
Vakuum trocknen			
100ul 1.0M Piperidin	verfahre wie bei		
90°C, 30min	G		
lyophilisieren >2h			
100ul Wasser			
lyophilisieren			
100ul Wasser			
lyophilisieren >2h			
200ul Wasser, lyoph.			
5ul Formamid-NaOH-			
Farbstoff			
90°C, 1min.			
auf Eis stellen			
Gel (1-2ul) laden			

Es ist besonders darauf zu achten, daß basisches NaAc für die Fällung der DNA nach der Basenmodifikation verwendet wird und nicht etwa saueres. Rückstände von saurem NaAc pH 5,3 puffern offensichtlich das Piperidin und bewirken eine unvollständige Spaltung des DNA-Stranges, was zu Zweideutigkeiten im Sequenzgel führt. Basisches Natriumazetat erschwert auch unerwünschte Seitenreaktionen von Hydrazin mit Guanylat nach dem Abstoppen der Pyrimidinreaktionen; als weiteres Gegenmittel zur Unterdrückung dieses Effekts empfiehlt Maxam und Gilbert, alle beteiligten Lösungen auf Eis zu halten. Aus diesem Grund ist hier für die Alkoholfällung -70°C vorgekühltes Äthanol verwendet worden.- Nach der letzten Alkoholfällung ist routinemäßig noch 2x mit kaltem 70% Alkohol gespült worden, um noch verbliebenes Hydrazin aus den Proben zu entfernen. Nach dem Spülen mit 1ml 95% Alkohol wurden die Proben 30min im Exsikkator getrocknet. Verbleibt Piperidin in den Proben, so führt dies zu völlig

unbrauchbaren Sequenzgelen. Ein Anzeichen hierfür ist das verzögerte Einwandern der radioaktiven Proben in das Gel, im Vergleich zu den beiden mitaufgetragenen Elektrophoresefarbstoffen. Extensives Lyophilisieren der Proben über Nacht, bei gleichzeitig wiederholtem Lösen der Rückstände in Wasser (insgesamt 0,5ml) schafft hier Abhilfe.

36. Präparation doppelsträngiger M13-Phagen DNA

Man streicht JM 103 auf Minimalplatte mit Thiamin aus; mit einer Einzelkolonie wird eine 10ml Vorkultur (YT-Medium) angeimpft. Gleichzeitig wird ein Plaque in 2ml 2x YT-Medium überführt und kräftig bei 37°C geschüttelt.

Nach 5h werden beide Vorkulturen vereint, und mit 2,4ml dieser Mischung werden 5 x 200ml YT-Medium in 2l Kolben angeimpft und über Nacht bei 37°C kräftig geschüttelt. Die weitere Aufarbeitung der ds Phagen-DNA erfolgt nach Birnboim (1983).

37. Präparation von M13 ssDNA

Eine JM 103 Kultur wird, wie oben beschrieben, angeimpft und bis $OD_{600} = 0,1$ inkubiert. In 50ml Flacon Röhrchen werden 3ml dieser Kultur pipettiert und mit jeweils einem Plaque infiziert. Die Röhrchen werden bei 37°C zwischen 5-7h kräftig geschüttelt. Jeweils 1,5ml bewachsenes Kulturmedium wird in ein Eppendorfgefäß überführt und abzentrifugiert. 1,2ml des Überstandes wird abgenommen und in ein neues Gefäß umgetopft.

0,15ml 20% PEG 6000/2,5M NaCl wird zugesetzt, und nach dem Mischen werden die Proben für 30min bei RT stengelassen. Mit einer Eppendorffzentrifuge wird der Niederschlag 15min bei RT abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen; nach nochmaliger Zentrifugation wird der noch verbliebene Rest des Überstandes abgenommen (ausgezogene Pasteurpipette verwenden). Das Pellet wird in 0,12ml TE gelöst und mit 0,1ml Phenol extrahiert. Nach 5min bei RT werden die Phasen durch kurzes Zentrifugieren getrennt. Die wässrige Phase wird abgenommen und mit 0,05ml Chloroform/Isoamylalkohol reextrahiert. 0,1ml Überstand wird abgenommen, mit 15µl 3M NaAc pH 5,3 versetzt und mit 0,3ml Äthanol präzipitiert. Die Probe wird für 30min bei -70°C eingestellt. Nach dem Abzentrifugieren wird das Pellet in 0,1ml 0,1M NaAc pH 5,3 resuspendiert und mit 3 Volumen Alkohol repräzipitiert. Das Pellet wird 3x mit 70% Alkohol gewaschen; die Wandung des Eppendorffgefäßes wird ausgewischt, die DNA wird im Exsikkator getrocknet und in TE 20µl aufgenommen.

38. Ligation kohäsiver Enden

Für die Klonierung von Restriktionsfragmenten in doppelsträngige M13 Phagen DNA sind kohäsive Enden, wegen der besseren Ligationseffizienz, stumpfen Enden vorzuziehen. Außerdem können bei einem Doppelverdau solche Fragmente mit definierter Orientierung umkloniert werden. Um eine Rezyklisierung der Phagen-DNA zu vermeiden, wurde sie vorher mit alkalischer Phosphatase behandelt.

dephosphorylierte Vektor-DNA (0,1µg)	1 µl
DNA-Restriktionsfragment	
10x Ligationspuffer	2 µl
2mM rATP	2 µl
H ₂ O	ad 19 µl
Zugabe von 1U (1µl)T4 Ligase	

Die Reaktion wurde zunächst bei 18°C gestartet und nach 0,5-1h auf 14°C abgekühlt. Der Ligationsansatz befand sich dabei in einem offenen Thermosgefäß und wurde so in den Kühlraum gestellt. Nach vielen Stunden ist langsam die Temperatur auf 4-6°C absunken.

10x Ligationspuffer: 200mM Tris pH 7,5
 100mM MgCl₂
 50mM DTT

39. Infektion von Bakterienzellen mit M13 Phagen

Rekombinierte Phagen sollten nie längere Zeit als Plaques oder in infizierten Bakterien gelagert werden, da Inserts verlorengehen oder andere Veränderungen auftreten können. Deshalb wird entweder die einzelsträngige Phagen-DNA oder die doppelsträngige replikative Form gelagert. Sehr bequem ist es auch, das infektiöse Virus einzufrieren und bei Bedarf Bakterienzellen wie folgt zu infizieren:

0,2ml JM 103 (OD₆₀₀ = 0,5)
0,1ml einer Phagen-Verdünnungsreihe

zusammengeben, mischen und 10min bei 37°C inkubieren.

Nun zu den Röhrchen 3ml Soft-Agar (45°C), 10µl IPTG und 50µl

X-Gal zugeben, mischen und auf angewärmte Agarplatten (37°C) verteilen.

40. M13-Didesoxy-Sequenzierung

dNTP-Vorratslösungen:	10mM dATP	5,89mg/ml
	10mM dCTP	5,51mg/ml
	10mM dGTP	6,09mg/ml
	10mM dTTP	5,83mg/ml

in Wasser oder 1mM Tris/HCl pH 8 lösen und bei -20°C lagern.

ddNTP-Vorratslösungen:

10mM ddATP, 10mM ddCTP, 10mM ddGTP, 10 mM ddTTP
jeweils 4µmol in 0,4ml lösen und bei -20°C lagern.

dNTP/ddNTP-Mischungen:

	"T"	"C"	"G"	"A"
0,5 mM dTT	2,5 µl	50 µl	50 µl	50 µl
0,5 mM dCT	50	2,5	50	50
0,5 mM dGT	50	50	2,5	50
5mM ddTTP	14	-	-	-
5mM ddCTP	-	1,5	-	-
5mM ddGTP	-	-	5	-
5mM ddATP	-	-	-	0,2 für ³⁵ S 0,8 für ³² P
TE	100	100	100	50

(TE: 10mM Tris pH 7,5, 0,1mM EDTA)

"Chase"-Lösung:

0,25 mM dTTP
0,25 mM dCTP
0,25 mM dGTP
0,25 mM dATP

Beide Mischungen werden bei -20°C gelagert.

I. Hybridisierung des universellen 17-mer Primers (PL- Biochemicals) an seine Matrize:

0,5 μg Matrize
2,0 μl 1:2 verd.TM (TM: 100mM Tris pH 8, 100mM MgCl)
0,25 pmol Primer
ad 10 μl mit H_2O

1h bei $55-60^{\circ}\text{C}$ inkubieren (nach dieser Inkubation können die Proben tiefgefroren werden).

II. Herstellung der Klenow-Mischung (bemessen für 8 Reaktionen):

100mM Tris/HCl pH 7,5	2,0 μl
100mM DTT	2,5 μl
^{32}P -dATP ($>800 \mu\text{Ci}/\text{mmol}$)	5,0 μl
Klenow-Polymerase 6U	2,0 μl
dd H_2O	ad 20 μl

(DTT-Stock aliquotieren und nur 1-2mal verwenden)

III. Ansetzen der Sequenzreaktionen:

a)

A: 2 μ l Annealing-Mix + 2 μ l "A" Mix + 2 μ l Klenow-Mix

C: 2 μ l Annealing-Mix + 2 μ l "C" Mix + 2 μ l Klenow-Mix

G: 2 μ l Annealing-Mix + 2 μ l "G" Mix + 2 μ l Klenow-Mix

T: 2 μ l Annealing-Mix + 2 μ l "T" Mix + 2 μ l Klenow-Mix

b) Die Reaktionen gleichzeitig durch Zentrifugieren starten und 20min bei RT inkubieren.

c) 2,0 μ l Chase-Lösung zusetzen und nochmals 20min bei RT inkubieren.

d) Zugabe von 6 μ l Stopplösung (99% deion. Formamid, 10mM EDTA pH 8,3, 0,3% Xylencyanol FF, 0,3% Bromphenolblau)

e) Die Proben werden für 2-3 min im Wasserbad gekocht und sofort auf das Sequenzgel aufgetragen.

Die dNTP/ddNTP Mischungen enthalten folgende Nukleotidkonzentrationen:

"T": 5,8 μ M dTTP, 324 μ M ddTTP, 116 μ M dNTP (G,C)

"C": 5,8 μ M dCTP, 36,8 μ M ddCTP, 116 μ M dNTP (G,T)

"G": 5,8 μ M dGTP, 120 μ M ddGTP, 116 μ M dNTP (C,T)

³²P-"A" 20 μ M ddATP, 116 μ M dNTP (C,T,G)

³⁵S-"A" 5 μ M ddATP, 116 μ M dNTP (C,T,G)

41. Standard-Sequenzgele

Die hier verwendeten Gele sind 20, 8 oder 6% Polyacrylamid in 7M Harnstoff mit dem üblichen Format 200x400x0,3 mm (Sanger, Coulson 1978). Die "Öhrchen"platte wird silikonisiert mit einer 2%igen Lösung Dimethyldichlorosilan in 1,1,1,Trichloräthan. 5ml dieser Lösung wird im Abzug gleichmäßig verteilt und nach 10min mit Wasser gespült und trocken gerieben. Die andere Platte wird mit Bind-Silan behandelt, wodurch das Gel kovalent auf die Gelplatte gebunden wird. Hierzu werden 75 μ l γ -Methacryloxypropyltrimethoxysilan mit 25ml Alkohol verdünnt und mit 0,75 ml 10% Essigsäure angesäuert. Die Lösung wird gleichmäßig verteilt, und nach 10 min wird die Glasplatte mit Alkohol gespült und trocken poliert.

40% Acrylamid-Lösung: 38 g Acrylamid
 2 g N,N'-Methylenbis(acrylamid)

mit Wasser ad 100 ml auffüllen

10x TBE-Puffer: 109 g Tris
 55 g Borsäure
 50 ml 0,4M EDTA

Elektrophoresepuffer: 1x TBE

50ml Ansätze zum Gießen eines Geles des angegebenen Formats:

Polyacrylamidkonz.	6 %	8 %	20%
40 % Acrylamid	7,5 ml	10 ml	25 ml
Harnstoff	25 g	25 g	25 g
10x TBE	5,0 ml	5 ml	5 ml
H ₂ O	ad 50ml		
10 % PER	0,33ml	0,33ml	0,33ml

Die Ansätze sind zu entlüften. Ein 10 ml Aliquot der jeweiligen Mischung wird entnommen, mit 20µl TEMED versetzt und für das Gießen von einem Stützgell (zum Abschluß der Glasplatten unten) verwendet. Zu den restlichen 40 ml gibt man 80 µl TEMED. Die Polymerisationsdauer beträgt ca. 60 min.

Vor dem Auftragen der Proben wurde ein Vorlauf bei 1600V für 30 min durchgeführt. Der eigentliche Lauf erfolgt bei 25-30 mA und ca. 1200V; dabei stellt sich eine Temperatur zwischen 50-60°C ein. Bei Temperaturen über 60°C besteht wegen ungleichmäßiger Erwärmung Gefahr, daß die Glasplatten springen.

42. Puffergradienten Sequenzgele (Biggin et al. 1983)

Für ein 6%iges Polyacrylamidgel sind zwei Lösungen unterschiedlicher Ionenstärke nötig:

A	B
0,5x TBE-Mix	2,5x TBE-Mix
92 g Harnstoff	92 g Harnstoff
10 ml TBE	50ml TBE
30 ml 40 % Acrylamid	30ml 40 % Acrylamid
	10 g Saccharose
	5mg Bromphenolblau
mit H ₂ O ad 200ml	mit H ₂ O ad 200ml
auffüllen, beide Lösungen bei 4°C lagern	

Für das Gießen eines Gels des Formats 200x400x0,3mm sind 8ml der Lösung B und 35ml der Lösung A getrennt in 2 Bechergläser zu füllen:

Zu A 75µl 25% PER, zu B 15µl 25% PER geben.

Die Polymerisation wird nun durch TEMED eingeleitet:

bei A 30µl bei B 6µl

Nach dem Mischen 8ml Lösung A in einer 20-25ml Glaspipette hochziehen u. mit 8ml Lösung B unterschichten. Durch Ansaugen von 1-2 Luftblasen den Stufengradient etwas mischen.

Die gefüllte Pipette an der Aussparung der Glasplatten ansetzen und den Inhalt langsam zwischen die ca. 30° geneigten Glasplatten laufen lassen. Nun mit Lösung A bis obenhin auffüllen und den Kamm hineinschieben.

Die Proben werden ohne Vorlauf des Gels aufgetragen und die Spannung wird wie oben beschrieben an die Gelapparatur angelegt.

Autoradiographie: Nach Beendigung der Elektrophorese wird die silikonisierte Glasplatte entfernt, und das Gel samt Glasplatte in 2l Fixierlösung (10% Essigsäure, 10% Methanol, 80% Wasser) für 30min überführt, um den Harnstoff aus dem Gel zu entfernen. Das Gel wird daraufhin im Ofen bei 60-80°C getrocknet und anschließend sofort autoradiographiert.

III. ERGEBNISSE:

Überblick der experimentellen Befunde, die für die Existenz eines Vorläufers von NGF sprechen.

Das Endprodukt der NGF-Biosynthese in der Mausspeicheldrüse ist der 7S Komplex, der aus dem NGF-Dimer, aus der zu den Kallikreinen zählenden α - und γ -Untereinheit und aus Zinkionen aufgebaut ist (Varon et al. 1968; Pattison, Dunn 1975). Nach extensiven Studien (siehe Greene und Shooter 1980) einigte man sich darauf, im 7S Komplex eine stabile Speicherform der β -Untereinheit zu sehen, die den NGF vor proteolytischem Abbau in diesem Gewebe bewahrt. Die Dissoziation des NGFs von diesem Komplex erfolgt erst bei sehr geringer Proteinkonzentration. Die Anwesenheit einer Serinprotease im Komplex, welche in Reassoziationsexperimenten mit stöchiometrischen Mengen von NGF, nicht jedoch mit 2,5S NGF (endständiges Arginin fehlt!) hemmbar ist, hat zu der Vermutung geführt, daß die reife NGF-Untereinheit aus einem Vorläufer mit einem mehr endständig gelegenen Arginin hervorgehen könnte (Angeletti und Bradshaw 1971; Perez-Polo et al. 1972). Viele Peptidhormone werden durch eine derartig angenommene Spaltung an spezifischen Arginin- oder Lysinresten prozessiert (siehe Steiner in Peptide Hormones). Für diese Hypothese sprachen einmal immunhistochemische Untersuchungen: NGF kann nur in Vesikeln der Tubularzellen der Speicheldrüse in unmittelbarer Nähe der Cytoplasmamembran, nicht jedoch im Golgi-Feld nachgewiesen werden. (Schwab et al. 1976). Zum anderen machten Markierungskinetiken mit Speicheldrüsengewebe einen solchen Vorläufer mit einer tentativen relativen Molekularmasse von 22.000 wahrscheinlich (Berger und Shooter 1977). Das Prozessierungsmodell beider Autoren sieht dabei eine ausgeprägte carboxyterminale Extension von NGF vor und steht damit ganz im Einklang mit dem Maturierungsmodell von EGF (Tayler et al. 1970), bei dem die hierfür zugrundeliegenden Befunde auf NGF völlig übertragbar

waren. Vorschnell war es jedoch bei ihrem Konzept der Prozessierung von NGF, eine aminoterminal Extension völlig auszuschließen, aber verständlich, zumal es ihnen für EGF glaubhaft gelang, eine pro-Sequenz am entgegengesetzten Ende nachzuweisen (Frey et al. 1979).

Bei den Versuchen, Vorläufer von NGF und EGF nachzuweisen, wurden stets Antiseren verwendet, die gegen das native Endprodukt gerichtet waren. Im Fall des NGFs bestehen dabei sehr geringe Chancen, ein Antiserum zu gewinnen, das eine zufriedenstellende Affinität zum Vorläufer hat, denn die Antikörper sind hauptsächlich gegen die native Konformation von NGF gerichtet. Diese teilt jedoch der Vorläufer nicht mit seinem Endprodukt, wie sich experimentell zeigen läßt (persönliche Mitteilung, H. Thoenen). Es wurde deshalb versucht, polyklonale Antikörper gegen die Primärstruktur von NGF zu erstellen, um das eigentliche Vorläuferprotein im Speicheldrüsenhomogenat zu identifizieren .

1. Immunologischer Nachweis von Vorläuferproteinen des NGFs der Maus

1.1. Darstellung des allgemeinen Konzepts

In der Speicheldrüse von männlichen Mäusen kommt NGF in besonders großen Mengen (1,5mg NGF/g Drüsennaßgewicht) vor. Er wird dort in großen sekretorischen Vesikeln (Schwab et al. 1976) gespeichert und in den Speichel durch den klassischen Ca^{2+} abhängigen Sekretionsmechanismus (Hirata und Orth, 1980) freigesetzt. Alle bisher identifizierten sekretorischen Proteine werden an membrangebundenen Polyribosomen translatiert und besitzen zwecks der Proteinsortierung ein Signalpeptid, das in den meisten Fällen abspaltbar und endständig gelegen ist (Scheele et al. 1978; siehe Review Walter et al. 1984). Aus diesem Grund ist ein prä-pro-NGF Molekül zu erwarten (prä steht für das Signalpeptid), mit nachfolgender, posttranslationaler Prozessierung über pro-NGF zum reifen Endprodukt. Trotz hohem Gehalt an Endprodukt im Gewebe ist mit einer relativ niedrigen, intrazellulären Konzentration an Vorläufer(n) zu rechnen, da eine Limitierung der spezifischen Protease(n) in diesem Gewebe sehr unwahrscheinlich ist. Mit anderen Worten, der wohlbekannte Sexualdimorphismus dieser Drüse, der auch die NGF-Biosynthese mit einschließt, sollte sich beim Weibchen nicht in einer Überproduktion des Vorläufers manifestieren (Lacassagne 1940; Caramia 1962). Vielmehr muß eine Regulation der NGF-Transkriptionseinheit durch Testosteron angenommen werden und nicht etwa eine durch Steroidhormon regulierte Prozessierung von pro-NGF durch Steuerung der Transkription spezifischer Proteasen.

Die niedrige Konzentration des Vorläufers in einem ultrazentrifugierten Zellhomogenat zwingt dazu, von herkömmlichen Methoden wie der Immunpräzipitation, die unweigerlich zu Kopräzipitaten führt und obendrein noch eine Immuntitration

notwendig macht, Abstand zu nehmen (Berger und Shooter 1977). Ein Ausweg stellt die Technik des Filter-Affinitäts-transfers dar, eine weiterentwickelte in situ Charakterisierung von Proteinen in Polyacrylamidgelen, auf Grund der Interaktion mit an Filter kovalent gebundenen Liganden (Ehrlich et al. 1979). Eine Alternative zu dieser Methode ist der Immunblot oder Western-Blot von Towbin et al. (1979), der die Idee der Replika Erstellung des Southern Blots mit allen wesentlichen Details konsequent auf Proteine überträgt, und lediglich zusätzlich den Transfer aus Polyacrylamidgelen durch Anlegen einer elektrischen Spannung erleichtert (siehe Material und Methoden unter Pkt.15). Die Sensitivität der Technik kann durch die Verwendung eines zweiten Antikörpers, der gegen den ersten gerichtet ist oder durch Protein A, das die konstante Region (F_c -Fragment) von IgGs zu binden vermag, erhöht werden. Unter optimalen Bedingungen, die in erster Linie von der Qualität, d.h. Spezifität und Affinität, des Antikörpers abhängt, lassen sich noch Proteine in einem Homogenat mit einem Gewichtsanteil von $< 0,01\%$ (w/w) (Ehrlich et al. 1979) oder mit einer Absolutmenge von 1-10 ng nachweisen (Symington 1981).

Wie schon mehrfach erwähnt, ist die Mehrheit der Antikörper eines polyklonalen Antiserums gegen das dimere, native Endprodukt NGF gerichtet. Somit ist der Nachweis von prä-pro-NGF nicht möglich, da eine Dimerisierung zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Biosynthese offensichtlich nicht erfolgt. Deshalb muß NGF nahezu irreversibel denaturiert und an der Ausbildung seiner Quartärstruktur gehindert werden, um sequenzspezifische und/oder Sekundärstruktur spezifische Determinanten zur Präsentation gegenüber dem Immunsystem des Versuchstieres zu bringen. Theoretisch läßt sich diese Absicht auf folgende Arten verwirklichen:

- a) NGF wird in Gegenwart eines chaotropen Agens reduziert, und die SH-Gruppen werden irreversibel blockiert.
- b) NGF wird reduziert, und seine freien SH-Gruppen werden

für eine bifunktionelle Kopplungsreaktion an ein Trägerprotein ausgenutzt.

- c) Isolation NGF spezifischer Peptide durch chemische oder proteolytische Spaltung, die nach Kopplung an einen Träger als Immunogen eingesetzt werden.

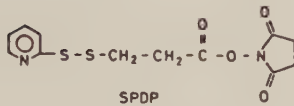
1.2. Gewinnung von Antikörpern, die das Monomer der β -Untereinheit erkennen.

1.2.1. Suche nach einer geeigneten Applikationsform für NGF, die die Quartärstruktur des Immunogens weitgehend ausschließt

Ursprünglich war beabsichtigt, unter denaturierenden Bedingungen NGF zu reduzieren und die verfügbaren SH-Gruppen als Reaktionspartner für ein heterobifunktionelles Agens (Abb. 1-1) zu nutzen, um das NGF-Monomer an ein Trägerprotein wie z.B. Thyreoglobulin zu koppeln. Diese intermolekulare Konjugation beeinträchtigt oder vielmehr verhindert eine vollständige Reoxidation und damit eine Rückfaltung des Monomers. Gleichzeitig wird ein großes Molekül (>670.000) als Immunogen geschaffen. Letzteres wirkt sich im allgemeinen positiv auf das Ausmaß der Immunantwort aus. - Der Kontrollversuch, die Konjugation von BSA an Thyreoglobulin, funktionierte zufriedenstellend: 50% des eingesetzten BSAs (trägt die SH-Gruppen für die Kopplung bei) beteiligte sich an der Reaktion, und ein recht ideales Verhältnis von 5 BSA Molekülen pro Thyreoglobulin ließ sich problemlos erzielen. Doch mit NGF (SH-Donator) als Kopplungspartner stellte sich das erwartete Ergebnis nicht ein. Nur etwa 7% des in die Reaktion eingesetzten NGFs ließ sich mit dem Trägerprotein kova-

lent verknüpfen. Auch eine Entlüftung der Lösungen und Stickstoffzufuhr, die einer schnellen Reoxidation der geöffneten Cystinbrücken entgegenwirken sollten, brachten nicht den gewünschten Erfolg. Möglicherweise vereitelte trotz allem noch Oxidation und sterische Behinderung den beabsichtigten Thioldisulfidaustausch. Die Kopplung von BSA (SH-Donator) an nativen NGF durch MBS (m-Maleimidobenzoyl-N-Hydroxysuccinimidester) mit anschließender Denaturierung, Reduktion und Blockierung der SH-Gruppen (von BSA und NGF) durch Carboxymethylierung führte zu einer Kopplung von 33% des angebotenen NGFs. Dieses Vorgehen erforderte jedoch die Abtrennungen verschiedener, niedermolekularer Substanzen und erschien deswegen umständlich und entsprach zudem auch nicht der ursprünglichen Vorstellung.

N-Succinimidyl 3-(2-Pyridyldithiopropionat



m-Maleimidobenzoyl-N-Hydroxysuccinimid Ester

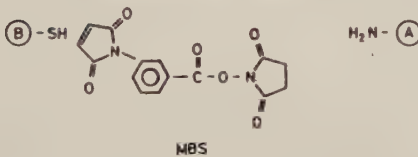


Abb. 1-1: Heterobifunktionelle Kopplungsreagenzien für die Konjugation von NGF über seine reduzierten SH-Gruppen an Trägerproteine wie z.B. Thyreoglobulin.

Eine sehr einfache Möglichkeit der Denaturierung bot sich durch die Cyanylierung von SH-Gruppen, also die Modifikation einer solchen Gruppe zu -SCN (siehe Material und Methoden unter Pkt.8.). Die Reaktion ist sehr einfach zu handhaben, der eingeführte Substituent ist äußerst klein und sollte somit ein schlechtes Hapten darstellen. Alle SH-Gruppen konnten auf diese Weise substituiert werden wie die spektroskopische Abschätzung der Konzentration des entstehenden Anions 2-Nitro-5-thiobenzoats ergab. Der so modifizierte NGF konnte direkt ohne Abtrennung niedermolekularer Substanzen einschließlich des SDS zur Immunisierung verwendet werden. Dies zeigte eine Probeimmunisierung von Mäusen und die Untersuchung ihrer Antiseren mit der Immunblot-Technik. Daraufhin wurden zwei Kaninchen mit diesem Immunogen behandelt und ein drittes Tier bekam cyanylierten, mit Glutaraldehyd vernetzten NGF zur möglichen Steigerung der Immunantwort verabreicht.

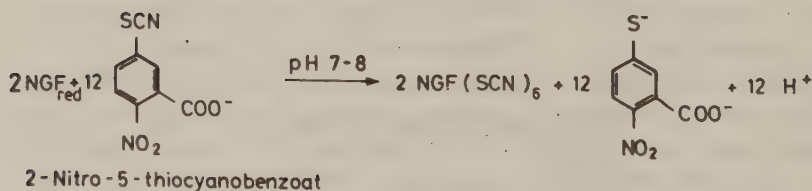


Abb. 1-2: Thiocyanylierung des reduzierten und denaturierten NGFs, um eine Rückfaltung des Proteins zu verhindern.

1.2.2. Prüfung der Antiseren auf immunologische Kreuzreaktion mit dem NGF-Monomer

Die unter 1.2.1. beschriebene spezielle Applikation von NGF zur Gewinnung von Antiseren zielt darauf ab, Antikörper zu erhalten, die das Monomer der β -Untereinheit erkennen. Eine einfache Möglichkeit zu prüfen, ob die Bemühungen erfolgreich waren, ist der Elektrotransfer von 2,5S NGF (Bocchini, Angeletti 1969) aus einem reduzierenden Laemmli-Gel auf Nitrozellulose (Einzelheiten zur Methodik des Immunblots siehe S. 26). Ein herkömmlich erstelltes polyklonales Schafantiserum gegen β -NGF sollte das auf Filter gebundene, partiell denaturierte Antigen schlecht oder überhaupt nicht erkennen, während die speziellen Kaninchenantiseren mit dem Monomer kreuzreagieren sollten. Das Ergebnis dieses Experiments ist stellvertretend für alle am Antiserum A in Abb. 1-3 gezeigt. Nach dem Überschichten des Filters mit ^{125}J markiertem Protein A läßt sich tatsächlich keine immunologische Kreuzreaktion vom Schaf Antiserum feststellen, hingegen sehr wohl vom Kaninchen Antiserum. Die Möglichkeit, daß das Schaf Antiserum vorwiegend aus IgMs besteht, die bekanntlich Protein A nur schwach, wenn überhaupt (Surolia et al. 1982) binden, konnte in einem Kontrollexperiment ausgeschlossen werden.

1.3. Die Antiseren gegen denaturierten und modifizierten NGF kreuzreagieren im Speicheldrüsenhomogenat der Maus mit Proteinen, die deutlich größer sind als 13kD.

Voraussetzung für die beabsichtigte Identifizierung von NGF Vorstufen in der Speicheldrüse der Maus, ist die Überprüfung der Antiseren im Immunblot gegen das NGF-Monomer gewesen. Das positive Resultat dieser Untersuchung kann als erster

Hinweis gewertet werden, mit der Immunblot-Technik einen praktikablen experimentellen Ansatz gewählt zu haben, denn eine unerwünschte Renaturierung der Proteine am Filter scheint, eine untergeordnete Rolle zu spielen (vergl. hierzu Abb. 1- 3 b). Für den erfolgreichen Nachweis sind aber noch zwei weitere Parameter ausschlaggebend: die intrazelluläre

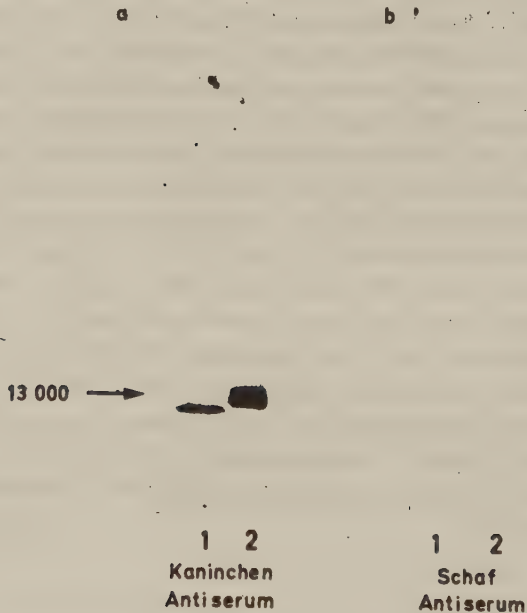


Abb. 1-3: Immunologischer Nachweis des Monomers von NGF im Western Blot.

20µg des 100.000g Überstandes des Homogenats (1a, 1b) der männlichen Speicheldrüse und präparierter 2,5S NGF (2) wurden in einem 15%igen reduzierenden SDS-Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die Filter wurden entweder mit Antiserum A (a) oder mit einem Schaf Antiserum gegen nativen NGF (b) inkubiert. Spezifisch gebundene Antikörper wurden mit iodiertem Protein A nachgewiesen.

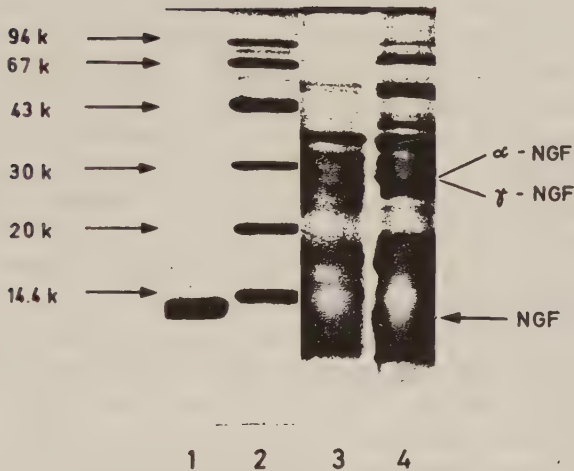


Abb. 1-4: Elektrophoretische Auftrennung des 100.000g Homogenats der Mausspeicheldrüse.

Der Überstand des Homogenats der Speicheldrüse beider Geschlechter wurde in einem 15%igen Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt. 2,5S NGF (1); Proteinstandards (2); Homogenat der weiblichen Maus (3); Homogenat von Männchen (4)

Konzentration des NGF-Präkursors, seine Stabilität gegenüber den während der Gewebshomogenisierung freigesetzten Proteasen und die Affinität der verwendeten Antikörper. Auf die Produktion bzw. Affinität der Antikörper kann man nur begrenzt und mehr indirekt Einfluß nehmen. Denkbare Maßnahmen wären z.B. die Verwendung mehrerer Immunisierungsprozeduren, die Variation der Adjuvantien und die Immunisierung einer größeren Anzahl von Tieren, u.U. auch unterschiedlicher Rasse. Dem proteolytischen Abbau sollte man jedoch weitgehend durch eine sorgfältige Auswahl geeigneter Proteasenin-

hibitoren begegnen können. Der Zusatz von Inhibitoren gegen Serinproteasen hat sich bei diesem Gewebe besonders bewährt (Berger et al. 1978) und ist lediglich noch durch Leupeptin (Schutz gegen Thiolproteasen) ergänzt worden. Doch diese Hemmer sind keine absolute Garantie gegen Proteolyse wie beispielsweise an der variablen Molekularmasse für NGF in den verschiedenen, abgebildeten Immunblots offenkundig wird. - Das Vorkommen großer Mengen an NGF in der Speicheldrüse der männlichen, nicht aber der weiblichen Maus läßt sich bereits im Coomassie-Blau gefärbten Proteingel des ultrazentrifugierten Rohhomogenats (Einzelheiten der Präparation siehe Methoden Pkt.11) feststellen (Abb. 1-4). Erwartungsgemäß induziert dieses 100.000g Homogenat das Auswachsen von Neuriten (Abb. 1-5) bei PC 12 Zellen (transformierte Rattenzelllinie des Nebennierenmarks).

Für die Identifizierung der NGF-Vorstufen wurde dieses Zellhomogenat männlicher nachpubertärer und weiblicher Tiere elektrophoretisch aufgetrennt, auf NC-Filter transferiert

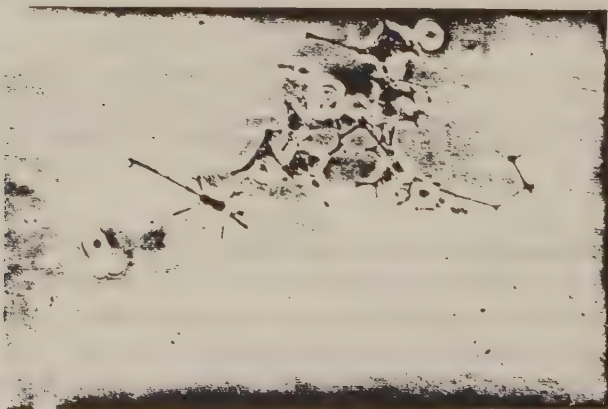


Abb. 1-5: Das 100.000g Homogenat der männlichen Speicheldrüse induziert das Auswachsen von Neuriten.

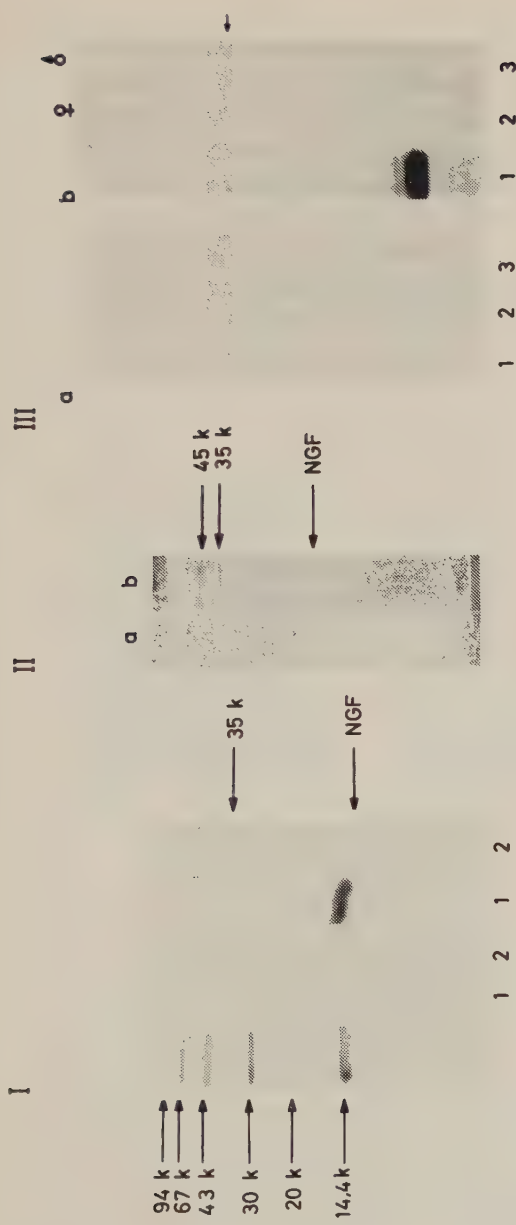


Abb. 1-6: Immunologischer Nachweis von NGF Präkursoren in der Speicheldrüse.

Die auf Nitrozellulose transferierten Proteine des 100.000g Homogenats wurden entweder mit Präimmuns-
 serum (a) oder mit spezifischen Kaninchen Antiseren gegen denaturierten NGF inkubiert. Als Nachweis-
 system dienten Anti-Kaninchen IgGs, die an Meerrettich Peroxidase gekoppelt sind. I. 2.5S NGF (1) und
 100µg Homogenat der männlichen Maus (2) wurden entweder mit Präimmuns serum (a) oder mit Antiserum B
 (b) inkubiert. II. 100µg ♂ Homogenat wurden entweder mit Präimmuns serum (a) oder mit Antiserum A (b)
 behandelt. III. Gereinigter NGF (1). Homogenat weiblicher, präpubertärer (2) und männlicher Mäuse
 wurden mit Präimmuns serum (a) bzw. spezifischem Antiserum A inkubiert. Beim Männchen ist der Vorläu-
 fer p35 ganz schwach zu erkennen (←). Deutlich sichtbar ist NGF im männlichen Homogenat und p45 in
 beiden Geschlechtern.

und mit dem Antiserum von Kaninchen A und B behandelt. Der zweite Antikörper gegen Kaninchen IgGs ist mit Peroxidase gekoppelt und bietet, z.B. mit Diaminobenzidin als Substrat, die Möglichkeit zum immunenzymatischen Nachweis. Die Empfindlichkeit dieser Farbreaktion reichte jedoch leider nur für den Nachweis von maturem NGF in der Speicheldrüse aus. Durch den Zusatz von zwei Schwermetallsalzen (Co^{++} und Ni^{++}), die im Laufe der Farbreaktion reduziert werden und ausfallen, kann die Empfindlichkeit des Nachweises deutlich gesteigert werden (Abb. 1-6 I, 2b; II, b). Es lassen sich nun drei für das Antiserum A spezifische Banden im Blot nachweisen, die abgesehen von der obersten, nicht mit reproduzierbarer Intensität auftraten (Abb. 1-6 III, 3b). Als Ergebnis dieser Versuche ist festzuhalten, daß die Antikörper A in der männlichen Speicheldrüse außer NGF mit ca. 13kD, ein weiteres Protein mit ca. 35kD erkennen. Darüber hinaus besteht noch in beiden Geschlechtern reproduzierbar und mit augenscheinlich gleicher Intensität eine immunologische Kreuzreaktion mit einem Protein von ungefähr 45kD (Abb. 1-6 III, b 2,3).- Ein Ergebnis, das erhebliche Konsequenzen hätte, falls es sich als NGF spezifisch bestätigen ließe.

Wegen der insgesamt noch nicht zufriedenstellenden Empfindlichkeit des Systems wurden die weiteren Experimente mit ^{125}J markierten Anti-Kaninchen IgGs durchgeführt. Eine erhöhte unspezifische Bindung bei dieser Nachweismethode konnte weitgehend durch den Zusatz von 10% (v/v) Ziegenserum und durch eine zehnfache Erhöhung der Konzentration an Detergenz (Nonidet P40) beseitigt werden. Die Antiseren B und C erkennen übereinstimmend das 45kD Protein nicht, jedoch in beiden Geschlechtern zwei Proteine mit variablen relativen Molekularmassen von ungefähr 28.000 und 18.000 (Abb. 1-7 Spur 2). Im Weibchen sind die Signale schwächer (Abb. 1-7 D, Spur 3), und in vorpubertären Tieren ist der mature NGF erwartungsgemäß nicht nachweisbar (Abb. 1-7 A, Spur 3). Nie konnten alle drei potentiellen NGF-Vorstufen 35, 28 und 18 kD gemeinsam beobachtet werden. Der interes-

santen Frage, ob die Weibchen während einer bestimmten Periode ihrer Entwicklung nun tatsächlich, wie es die Versuchsdaten nahelegen, das NGF Gen exprimieren, das Genprodukt aber nicht vollständig prozessieren können, ist hier und im weiteren Verlauf der Arbeit nicht näher untersucht worden. Das Hauptinteresse galt dem zweifelfreien Nachweis des 35kD

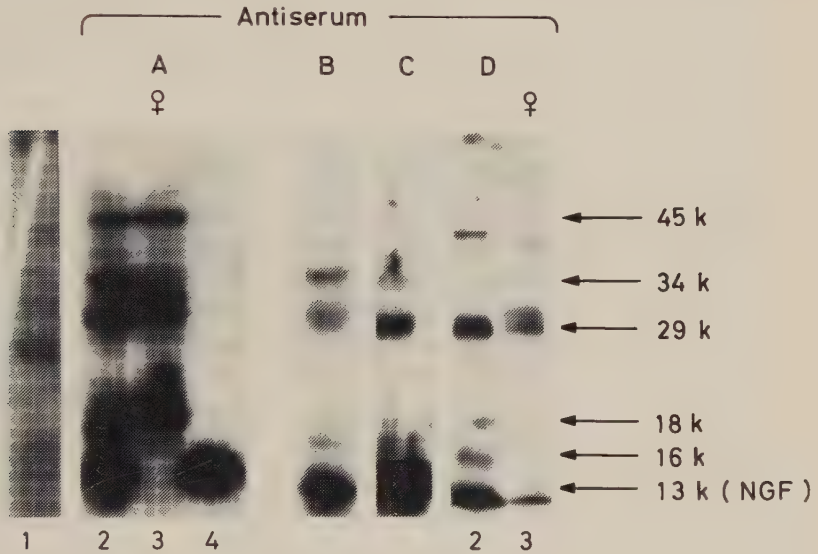


Abb. 1-7: Vergleich der Immunblots verschiedener Antiseren gegen denaturierten NGF

Die auf NC transferierten Proteine der Mausspeicheldrüse wurden mit den Antiseren A, B, C und D inkubiert. Zum Nachweis des Immunkomplexes dienen ^{125}J markierte Anti-Kaninchen IgGs. Die Proteine des 100.000g Überstandes wurden mit Präimmunserum von Kaninchen A inkubiert (1). In präpubertären ♀ Tieren (A, Spur 3) ist kein maturer NGF nachweisbar; in postpubertären Weibchen kann hingegen Vorläufer und prozessiertes Produkt gefunden werden (D 3). Die Filter B und C zeigen die potentiellen Vorläufer von NGF im Männchen: 34kD, 29kD und 16-18kD. Nur das Antiserum A erkennt in beiden Geschlechtern ein Protein von 45kD (A, Spur 2,3).

Proteins als dem primären Translationsprodukt des NGF-Gens. Deshalb bestand auch die Sorge, die für die Immunisierung der Kaninchen verwendete 2,5S NGF Präparation könnte Kontaminanten aufweisen, z.B. Renin (Evin et al. 1984) oder Aktin, welche zu Artefakten im Immunblot führen könnten. Mit einem Antiserum gegen gelelektrophoretisch gereinigten NGF ließen sich jedoch die potentiellen Vorläufer bestätigen (Abb. 1-7 D,2,3). Die Auswertung aller eindimensionaler Immunblots ermöglichte eine Abschätzung der Molekularmassen der "NGF- Vorstufen" auf dem 5% Niveau wie folgt:

35.000 $\pm$ 1100

28.000 $\pm$ 900

18.000 $\pm$ 2600

Diese immunologische Identifizierung reicht für sich allein nicht aus, ein größeres Protein als Vorstufe von NGF anzusehen, zumal im ursprünglich als negative Kontrolle gedachten Weibchen Vorstufen zu finden sind, die zudem noch unabhängig vom reifen Endprodukt im Homogenat vorkommen können (Abb. 1-7 A,3).

Eine weitgehende Übereinstimmung der Peptid-Fingerprints in Betracht kommender Proteine oder wenigstens einer der mutmaßlichen Vorstufen mit NGF müßte innerhalb der Grenzen dieser Technik zumindest die Bestätigung für die Tauglichkeit der Antiseren zur Identifizierung von NGF-Vorläufern liefern. Mit einigen Vorbehalten ließen sich dann die übrigen, nicht durch die Fingerprintanalyse charakterisierten Vorstufen in die Argumentation einschließen.

Zur Anfertigung von Fingerprints aus Homogenaten wird das betreffende Protein aus Coomassie angefärbten Polyacrylamidgelen herausgeschnitten, nach Elder et al. (1977) in situ jodiert und anschließend mit einer spezifisch spaltenden Protease behandelt. Dieses Vorgehen erfordert die vollständige Auftrennung des Proteingemisches, eine Voraussetzung, die bisher mit Sicherheit nicht erfüllt wurde. Eine bessere Auftrennung des 100.000g Homogenats in seine Bestandteile kann jedoch durch die Einführung einer zweiten Dimension, einer isoelektrischen Fokussierung erzielt werden, wobei die

Fraktionierung mittels des Laemmli-Systems unverändert erhalten bleibt.

1.4. Verbesserte Auftrennung der Proteine des Homogenats im 2D-Immunblot

Will man die mutmaßlichen NGF-Vorstufen über ihr tryptisches Peptidmuster näher charakterisieren, so müssen sie entweder aus dem Speicheldrüsenhomogenat teilweise angereichert werden, ein technisch schwieriges Unterfangen, oder aber man trennt das Homogenat über eine zweidimensionale Gelelektrophorese in seine Komponenten auf. Die erste Dimension, die isoelektrische Fokussierung sollte dabei zumindest für die ersten Experimente sowohl basische als auch saure Proteine gleichermaßen erfassen können. Letzteres ist wünschenswert, weil NGF einen isoelektrischen Punkt größer als 9 hat und im 2D-Blot ein kräftiges Signal als Orientierungshilfe liefert, aber fest damit zu rechnen ist, daß die Vorstufen diesen pH-Wert nicht mit ihm teilen werden. Die übliche isoelektrische Fokussierung von pH 3,5-10 (O'Farrell 1975), die als eine gute Möglichkeit für die Auftrennung eines Zellhomogenates beschrieben wurde, kommt weniger in Frage, weil ein Teil der basischen Proteine verlorengeht. Sie lassen sich nämlich wegen der Instabilität des pH Gradienten in diesem Bereich nicht stabil fokussieren oder dringen bei der üblichen Anordnung der Elektroden (Kathode oben) erst gar nicht in das Gel ein. Die "non equilibrium pH gradient" Elektrophorese (NEPHGE) schafft hier insofern Abhilfe als basische Proteine den gesamten Gradienten bis zu seinem basischen Ende durchwandern müssen, und die Auftrennung in der ersten Dimension nach derelektrischen Mobilität und dem isoelektrischen Punkt der einzelnen Proteine erfolgt. Im Gegensatz zur isoelektrischen Fokussierung wird kein Gleichgewichtszustand erreicht - die Elektrophoresedauer bestimmt

also die Verteilung der Proteine. Mit anderen Worten, nach ca. 1000- 1600Vh nähert sich die Elektrophoresegeschwindigkeit vieler Proteine dem Werte Null, während die Mobilität stark basischer Proteine nur herabgesetzt ist; nach 1000Vh können deshalb bereits einige dieser Proteine verloren gegangen sein. In diesem System nimmt man in Kauf, daß die Auftrennung der sauren Proteine wegen des steilen pH Gradienten schlecht ist. Dem kann man jedoch, falls es erforderlich wäre, durch die Kombination zweier 2D-Gele, eines IEF Gels pH 4-7 mit einem NEPHG pH 7-10, abhelfen.

Für das Speicheldrüsenhomogenat wurde ein NEPHG pH 3,5-10 mit einem 15% SDS Gel kombiniert. Der sich aufbauende pH Gradient wurde nach einem Lauf von 1600Vh und der Fokussierung von 500µg Homogenat gemessen und ist in Abb. 1-8 graphisch festgehalten. Die ausgeprägte Abflachung des Gradienten

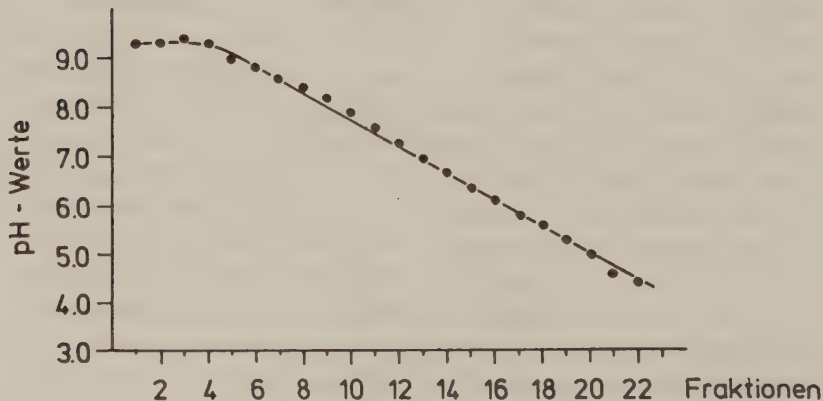


Abb. 1-8: Graphischer Verlauf des pH-Gradienten bei der NEPHGE

Der pH-Gradient einer "non equilibrium pH gel elektrophoresis" wurde nach 1600Vh und der Fraktionierung von 0,5mg Homogenat ermittelt. Hierzu wurde das Rundgel in Scheibchen zerschnitten und der pH-Wert in jeweils 0,8ml H₂O bestimmt.

ten im oberen Teil macht deutlich, daß NGF aus einem solchen Gel austreten kann. Um dem vorzubeugen und den richtigen Zeitpunkt für den Abbruch der Auftrennung des Homogenats nicht zu versäumen, wurde parallel Cytochrom c (500µg) aufgetragen, dessen isoelektrischer Punkt jenem von β NGF entspricht.

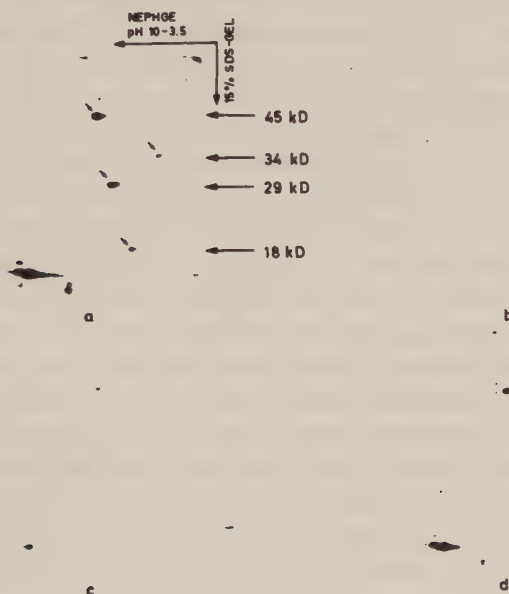


Abb. 1-9: Immunologischer Nachweis der Vorläufer von NGF in der Speicheldrüse der männlichen Maus mittels des 2D-Immunblots.

0,5mg Protein wurden 2-dimensional aufgetrennt und mit Antiserum A immungeblottet (a). An der Nitrozellulose adsorbierte, radioaktive Immunkomplexe wurden mit saurem Glyzinpuffer abgelöst (b) und das Filter wurde daraufhin mit Präimmunserum überschichtet (c). Nach nochmaligem Ablösen gebundener Radioaktivität wurde das Filter erneut mit spezifischem Antiserum überschichtet (d).

Zweidimensionaler Immunblot des Homogenats männlicher und weiblicher Tiere

Jeweils 0,5mg Protein beider Geschlechter ist parallel aufgetragen und wie beschrieben (Methoden siehe unter 14.) zweidimensional aufgetrennt worden. Nach dem Elektrotransfer auf Nitrozellulose ist das Gel der männlichen Maus mit Coomassie R250 angefärbt und für die geplante Entnahme der Gelstückchen für die Fingerprintanalyse aufbewahrt worden. Die Übersichtung des Filters mit Antiserum A und mit radioaktiv markierten Ziegen-Anti-Kaninchen IgGs erfolgte wie beim 1-dimensionalen Blot. In der Autoradiographie findet man neben dem kräftigen Signal von NGF die bereits schon unter 1.3. beobachteten Proteine wieder (Abb. 1-9 a). Der belichtete Röntgenfilm wurde mit dem dazugehörigen angefärbten Gel zur Deckung gebracht, und die entsprechenden Acrylamidstückchen wurden aus dem Gel mit dem darin verbliebenen Rest an Protein herausgestanzt. Insgesamt wurden auf diese Art acht verschiedene Proben für die spätere Fingerprintanalyse entnommen. Beim Immunblot der weiblichen Maus ist durch Vorinkubation des Filters mit Präimmunserum und anschließender Absättigung unspezifisch haftengebliebener Antikörper der "Background" des Blots gesenkt worden (siehe Methoden Pkt. 15). In der Autoradiographie treten bei der Verwendung von Antiserum A die beiden wiederholt aufgefundenen Proteine um ca. 28.000 und 45.000kD hervor (Abb. 1-10).

Das Protein 28 und NGF besitzen gemeinsame antigene Determinanten

Die spezifische Kreuzreaktion von Antiserum A mit Proteinen des Homogenats soll nochmals konsequent an einem Beispiel demonstriert werden. Wie unter Abb. 1-9 beschrieben, wurde bisher die negative Kontrolle mit Präimmunserum erst im Anschluß an die Inkubation des Filters mit spezifischem Antiserum durchgeführt. Vor diesem wichtigen Kontrollversuch mußte deshalb der Filter zunächst mit Glycinpuffer pH 2,2 behandelt werden, um die Immunkomplexe zu zerstören und die

gebundene Radioaktivität abzuwaschen. Jetzt sollen die negativen Kontrollen, Inkubation mit ^{125}J markierten Anti-Kaninchen Antikörpern und mit Antiserum A in Gegenwart eines Überschusses an $\text{NGF}-(\text{SCN})_x$ zuerst durchgeführt werden.

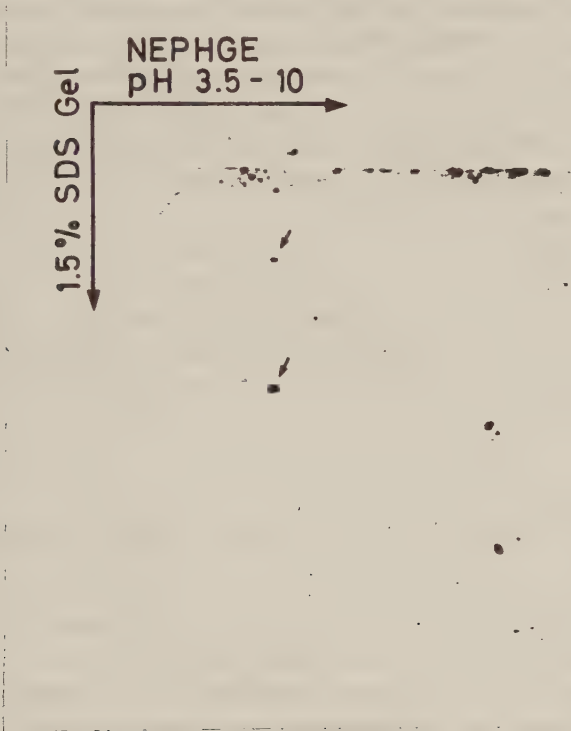


Abb. 1-10: 2D-Immunblot präpubertärer weiblicher Mäuse.

Wie bei den männlichen Tieren wurde 0,5mg 100.000g Überstand der Speicheldrüse 2-dimensional aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Der Filter wurde zunächst mit Präimmuns-
serum und unmarkierten Anti-Kaninchen IgGs behandelt, um unspezifische Bindungen am Filter abzusättigen. Nach der Inkubation mit spezifischem Antiserum A wurde der Blot mit jodmarkierten Anti-Kaninchen IgGs (ca. $1 \cdot 10^6$ cpm/ml) überschichtet. In der Autoradiographie findet man wie beim Männchen eine immunologische Kreuzreaktion mit dem 45kD und mit dem 29kD Protein.

Ausgegangen wurde von dem Replikon eines 2D-Gels (8), welches nacheinander mit den entsprechenden Seren behandelt wurde (Abb. 1-11). Dabei sind während des gesamten Versuchsablaufs sich wiederholende Inkubationsschritte mit Aliquots derselben Lösung durchgeführt worden, um denkbare Nebeneffekte auszuschließen. Weder markierte Anti-Kaninchen IgGs noch Antiserum A kann in Gegenwart eines Überschusses an modifizierten NGF an den Blot binden (Abb. 1-11 a,b). Dies macht augenscheinlich, daß denaturierter NGF und Protein 28kD gemeinsame antigene Determinanten besitzen (Abb.1-11 c).

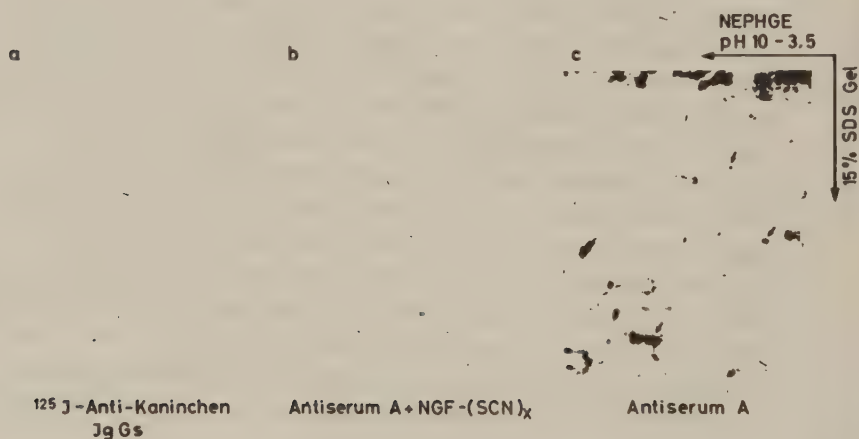


Abb. 1-11: Nachweis der immunologischen Verwandtschaft von Protein 29kD mit denaturiertem NGF

Fig 2D-Blot des männlichen Homogenats wurde zunächst nur mit ^{125}I -markierten Anti-Kaninchen IgGs inkubiert (a). Die Bindungsstellen des Antiserums A kompetieren erfolgreich mit denaturiertem NGF (0,1mg/ml) im Inkubationspuffer (b). (c) zeigt die immunologische Kreuzreaktion von Antiserum A mit den Proteinen des Homogenats P45, P29 und NGF.

1.5. Überprüfung der immunologischen Daten mittels der Fingerprintanalyse

Der zweidimensionale Immunblot hat im wesentlichen vier Proteine (18, 28, 35 und 45kD) geliefert, die sich von weiteren, schwächeren Signalen (die auch unterdrückt werden können) abheben. Somit steht er im Einklang mit den Resultaten des eindimensionalen Blots und kann für die Charakterisierung dieser Proteine herangezogen werden. Wie bereits erwähnt, werden hierzu die durch den Immunblot in ihrer Position festgelegten Proteine dem Gel entnommen, direkt ohne Elution aus dem Acrylamid jodiert und enzymatisch verdaut. Die Peptide diffundieren aus dem Gel und können nun durch eine zweidimensionale Chromatographie auf einer Zellousedünnschichtplatte mit unterschiedlichen Laufmitteln aufgetrennt werden.

Vergleichende Peptidanalyse des 18kD Proteins mit NGF

Beide Proteine (P 18 und maturer NGF) wurden unter identischen Bedingungen jodiert und mit Trypsin/Chymotrypsin begrenzt verdaut. Reines Trypsin wurde absichtlich nicht verwendet, da dieser Verdau bei NGF nur zu zwei markierten Peptiden führt (siehe später) und somit die Aussagekraft der Methode in unerwünschter Weise einschränken würde. Der Vergleich der Peptidmuster beider Proteine läßt die Beurteilung nicht schwerfallen: innerhalb der Genauigkeit der Methode wiederholt sich in beiden Fingerprints die geometrische Anordnung und die Intensität einzelner Peptide zueinander (Abb. 1-12). Jene drei Peptide, die in Abb. 1-12 A durch Pfeile gekennzeichnet sind, wurden für einen Kontrollversuch von beiden Dünnschichtplatten eluiert und entsprechend miteinander kombiniert, um ihr identisches zweidimensionales Laufverhalten augenscheinlich zu machen (Abb. 1-12).

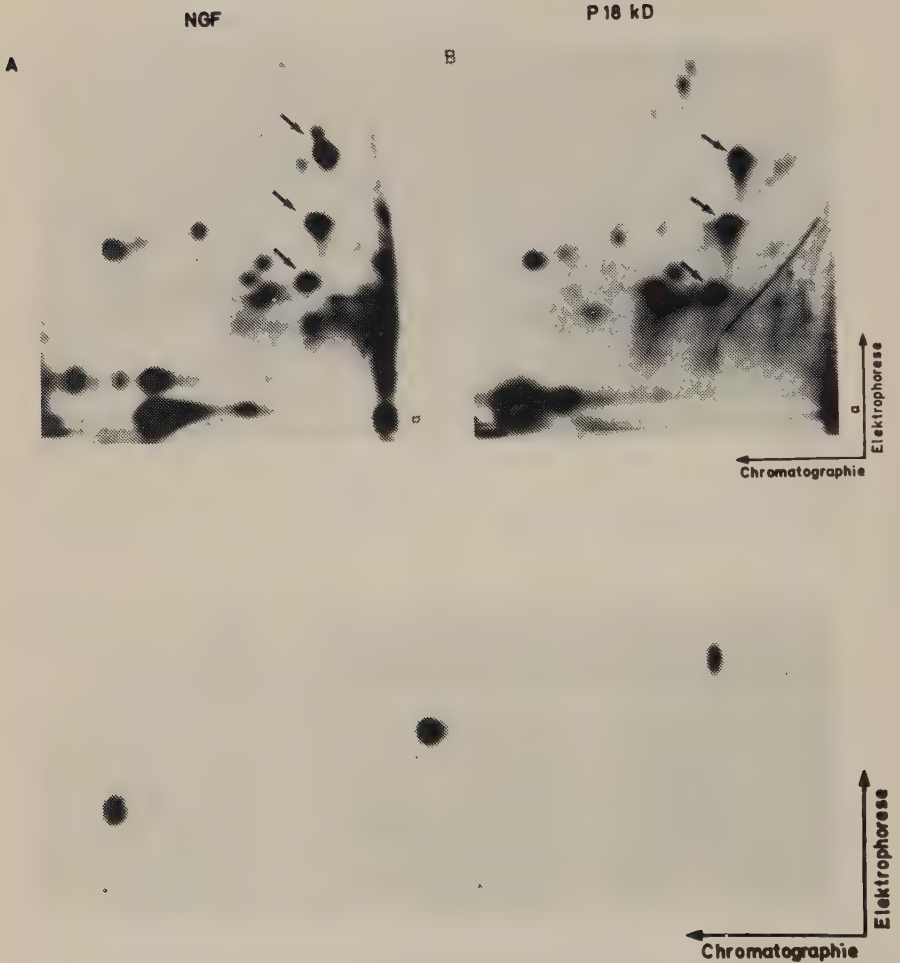


Abb. 1-12: Zweidimensionale Peptidkartierung von 2,5S NGF und vom Vorläufer P 18kD

Beide Proteine wurden einem 2D-Gel entnommen und nach Elder et al. (1977) im Polyacrylamidgel jodiert. Nach einem tryptischen/chymotryptischen Verdau wurden die Peptide zweidimensional auf Dünnschichtplatten aufgetrennt und autoradiographiert (A,B). Die mit Pfeilen gekennzeichneten Peptide wurden vom Trägermaterial eluiert, und einander entsprechende Peptide beider Proteine wurden auf ihre gleiche Mobilität im 2D-System geprüft (C).

Gemäß dieser experimentellen Befunde, handelt es sich also beim 18kD Protein mit großer Wahrscheinlichkeit um eine Vorstufe des NGFs. Die Relevanz dieser Vorstufe für die physiologische Prozessierung von NGF kann jedoch mit solchen Studien nicht beantwortet werden.

Fingerprints des 45kD Proteins und der beiden kleineren immunologisch identifizierten Vorstufen

Wegen der besseren Übersichtlichkeit und der zu erwartenden Komplexität des Fingerprints von P45 wurde für diese Analyse reines, TPCK behandeltes Trypsin verwendet, um einer Restaktivität an Chymotrypsin vorzubeugen. Entsprechend der gesetzten Erwartung vereinfachte sich das Peptidmuster des enzymatischen Verdaus von NGF beträchtlich (Abb. 1-13). Die Peptidkarte einer Vorstufe von NGF sollte dabei die beiden in Abb. 1-13 I,B aufgezeigten Peptide von NGF enthalten, weil diese aus der Mitte der NGF-Sequenz herausgeschnitten werden. Das in der elektrophoretischen Dimension langsamer wandernde Peptid von NGF schien dann tatsächlich im P45-Verdau (Abb. 1-13 I,A), ein Pendant auf Grund des nachgewiesenen identischen Laufverhaltens zu besitzen (Abb. 1-13 I,C). Die Nichtidentität beider Peptide trat jedoch im daraufhin vorgenommenen Nachverdau mit Chymotrypsin zutage (Abb. 1-13 II,C), so daß die schon früher gehegten Zweifel bezüglich dieses Proteins sich nun bestätigt fanden. Umfangreiche Bemühungen, einen Zusammenhang auf dem Peptidniveau zwischen P35 bzw. P28 und NGF herzustellen, mißlangen; auch glückte es nicht, eine Verwandtschaft einzelner Vorstufen untereinander reproduzierbar aufzuzeigen. Hoffnungsvolle Übereinstimmungen im Laufverhalten einzelner Peptide gelangen zwar öfters, besonders bei eindimensionaler Auftrennung, hielten dann aber später strengeren Kriterien der Identität nicht stand. Weitere Untersuchungen wurden abgebrochen, als von



Abb. 1-13: Das Protein 45 ist kein primäres Translationsprodukt von NGF.

Die radioaktiv markierten, tryptischen Peptide von P45 und 2,5S NGF wurden chromatographisch aufgetrennt (IA, IB). Die Peptidkarten beider Proteine schienen ein gemeinsames Peptid zu enthalten. Dies wurde zumindest durch den zweidimensionalen Gleichlauf beider Peptide nahegelegt (I C). Der getrennte II A(P45), II B(NGF) und der gemeinsame Unterverdau (II C) beider Peptide mit 50µg/ml Chymotrypsin und die nachfolgende Auftrennung sprechen jedoch gegen eine solche Identität.

der erfolgreichen Klonierung von NGF berichtet wurde, und sich damit zuverlässigere Methoden für die Identifizierung des primären Translationsprodukts eröffneten.

1.6. Zusammenfassung

Eine Reihe experimenteller Befunde sprachen für die Existenz eines Vorläuferproteins für β NGF, welches vermutlich durch die γ -Untereinheit des 7S Komplexes prozessiert wird. Der überzeugende Nachweis des Vorläufers konnte jedoch nicht erbracht werden, weil Antikörper gegen NGF den Vorläufer nicht erkennen. Deshalb wurden Antiseren gewonnen, die mit dem Monomer der β -Untereinheit kreuzreagieren, also nicht mehr vorwiegend gegen die Quartärstruktur des Dimers gerichtet sind. Mit dem Immunblot konnte eine relativ kleine Vorstufe (18kD) aufgefunden werden, die sich durch Peptidkartierung bestätigen ließ. Damit erkennen die Antiseren gegen denaturierten NGF nachgewiesenermaßen NGF-Vorläufer. Das größte von allen Antiseren erkannte Protein besitzt ein im SDS-Gel abgeschätztes Molekulargewicht von 35.000 $\pm$ 1000. Es erscheint deshalb berechtigt, dieses Protein als das primäre Translationsprodukt der NGF-Transkriptionseinheit vorzuschlagen. Doch die Vorläufer P35 und P28 lassen sich

nicht nur in der Speicheldrüse der männlichen, sondern auch in präpubertären weiblichen Mäusen nachweisen; zu diesem Zeitpunkt ließ sich mit dem Immunblot jedoch kein reifer NGF auffinden. Mit anderen Worten, in Weibchen dieses Alters ist vermutlich das intrazelluläre Verhältnis von NGF zu seinen Vorstufen eklatant zu gunsten der letzteren verschoben. Diese präliminären Beobachtungen würden zumindest, während einer gewissen Entwicklungsphase, für eine Regulation durch Transkription und durch Prozessierung auf dem Proteinniveau sprechen.

2. Immunologische Analyse in vitro translatierter Proteine der männlichen Speicheldrüse

Frühere Bestrebungen schlugen fehl, das primäre Translationsprodukt von NGF nach einer in vitro Translation durch Immunpräzipitation nachzuweisen. Wie schon mehrmals dargelegt mißlang dies, weil prä-pro-NGF und NGF keine gemeinsamen antigenen Determinanten an ihrer Oberfläche präsentieren. Darüber hinaus machten diese Versuche deutlich, daß keine komplette endogene Prozessierung von prä-pro-NGF zum Dimer durch eine cotranslatierte Protease oder durch sonstige Proteasen des Retikulozytensystems in nennenswertem Umfang erfolgt. Anderenfalls hätte man die β -Untereinheit in solchen Ansätzen durch polyklonale oder durch monoklonale Antiseren ohne Schwierigkeiten immunpräzipitieren können. Die Prozessierung durch die cotranslatierte γ -Untereinheit als der einzigen charakterisierten Protease, der Darling et al. (1983) derzeit die komplette Prozessierung von pro-NGF zutrauen, scheint nicht oder besser nur in vernachlässigbarer Weise zu erfolgen. Letzteres mag deshalb so ineffizient sein, weil das primäre Translationsprodukt dieser Protease selbst einen Prozessierungsprozeß zu durchlaufen hat, bevor es biologische Aktivität erlangt (Swift et al. 1982).

Gemäß diesen Ausführungen bestehen also gute Chancen, den nichtprozessierten Vorläufer von NGF im in vitro Translationsansatz mittels der unter 1.2. beschriebenen Antiseren gegen das NGF-Monomer immunpräzipitieren. Dieser experimentelle Ansatz umgeht das Problem der Freisetzung von Proteasen, weil mit einer ausgeprägten posttranslationalen Aktivierung von Kallikreinen im zellfreien System nicht zu rechnen ist. Der vorgeschlagene prä-pro-NGF von 34kD sollte sich also bestätigen lassen, wobei die Denaturierung der Proteine des Lysates mit Natriumdodecylsulfat vor der Immunpräzipitation eine Voraussetzung ist (siehe 1.2.) und eine nicht zu unterschätzende experimentelle Schwierigkeit darstellt.

2.1. In vitro Translation von poly(A)⁺RNA der männlichen Speicheldrüse

Obwohl die männliche Speicheldrüse von Balb c Mäusen und von dem afrikanischen Nager *Mastomys natalensis* (Callissano et al. 1984) derzeit als die reichsten Quellen für NGF betrachtet werden, kommt der spezifische Gehalt an NGF gegenüber löslichem Protein nicht über 1% (w/w) hinaus (Aloe et al. 1981). Wegen der Speicherung von NGF in diesem Organ (Schwab et al. 1976) ist mit Sicherheit der relative Anteil der mRNA für NGF (mRNA^{NGF}) niedriger anzusetzen und dürfte zur Klasse von mRNAs zählen, die mit mittlerer Häufigkeit vorkommen. Für die geplante Immunpräzipitation von prä-pro-NGF wird deshalb eine mRNA Präparationsmethode, die nahezu vollständig die Degradation der RNA verhindert, genauso wichtig sein wie optimale Bedingungen für die in vitro Translation.

2.1.1. Isolation intakter mRNA mittels der Guanidiniumthiocyanat Methode

Die anfänglichen Versuche, cytoplasmatische RNA aus der Speicheldrüse mittels der gängigen Phenolextraktion (z.B. Shore et al. 1977) zu gewinnen, endeten stets in einer partiellen Degradierung des präparierten Materials, trotz der

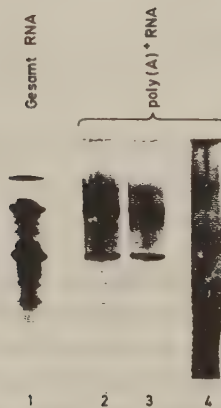


Abb. 2-1: Extraktion von RNA aus der submandibularen Speicheldrüse der Maus.

Die Integrität der präparierten RNA ist an Hand eines Agarose-Harnstoff-Gels überprüft worden. Spur 1: gesamte RNA vor der oligo(dT) Säule. ♀ (2), ♂ (3) poly(A)⁺ RNA nach einmaliger Passage über die Säule - die diskreten Banden der ribosomalen RNA sind deutlich sichtbar; Spur 4 eluierte ♂ poly(A)⁺ RNA nach Waschung der Säule mit Puffer intermediärer Ionenstärke.

Pulverisierung und trotz des Zusatzes von Saccharose, welche in Gegenwart eines nichtionischen Detergenz wie Triton X 100 die Lysosomen stabilisieren soll. Als Ursache für diese Beobachtung wurde ein hoher Gehalt an endogener Ribonukleaseaktivität angenommen, ähnlich wie bei Pankreasgewebe, und deshalb eine der vielen verwandten Methoden für die RNA-Extraktion ausgewählt (Cirelli et al. 1982), die Guanidiniumthiocyanat als chaotropes Agens im Homogenisierungspuffer verwenden. Letzteres dissoziiert nicht nur die Ribonukleoproteinkomplexe, sondern inaktiviert bei geringem Kostenaufwand sehr erfolgreich endogene Ribonukleasen (siehe z.B. Chirgwin et al. 1979, Cathala et al. 1983). Ein Ultrazentrifugationsschritt durch ein Cäsiumchloridkissen ausreichender Dichte trennt effizient die DNA, wegen ihres Unvermögens in dieses Kissen einzudringen, von der RNA ab, welche pelletieren kann. Die Intaktheit der RNA wurde vor und nach der poly(A)⁺ Präparation über eine oligo(dT) Zellulosesäule in einem Harnstoff-Agarosegel überprüft. Nach der Elution der poly(A)⁺ RNA vom Säulenmaterial ist diese immer noch stark mit ribosomaler RNA verunreinigt (Abb. 2-1 Spur 2 u.3). Diese Verunreinigung kann durch wiederholtes Auftragen des eluierten Materials auf die Säule oder durch extensives Spülen der gebundenen RNA mit einem Puffer intermediärer Ionenstärke vermieden werden (siehe Methoden Pkt. 17). Letzteres wurde bevorzugt und erwies sich so wirkungsvoll, daß es bei einer einmaligen Passage über oligo(dT) blieb (Abb. 2-1 Spur 4). Aus 4,5g (Frischgewicht) Speicheldrüsen-gewebe konnte laut OD-Messung (1 OD = 40 µg/ml) 3,3mg zelluläre RNA isoliert werden, wovon 0,5mg gemäß seiner Affinität zum Säulenmaterial als poly(A)⁺ RNA eluiert werden konnte. Die biologische Aktivität dieser RNA ließ sich an Hand einer in vitro Translation mit einem selbsthergestellten Kaninchen Retikulozytenlysat nachweisen (Abb. 2-2).

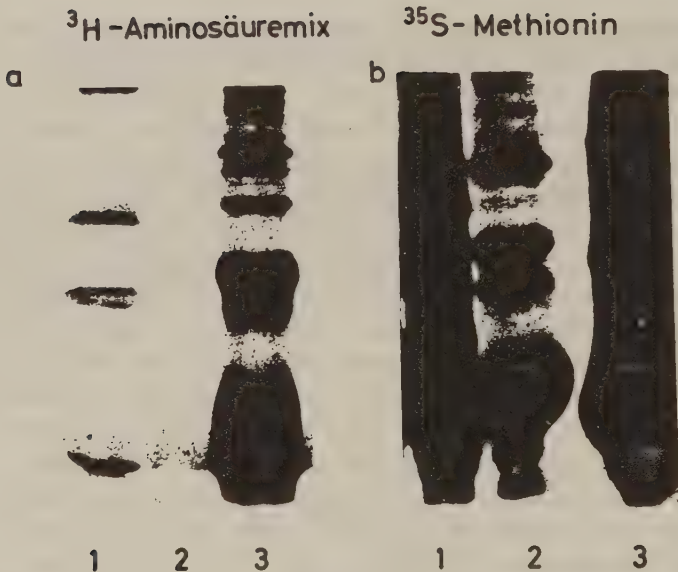


Abb. 2-2: In vitro Translation von mRNA der männlichen Mausspeicheldrüse

Die biologische Aktivität eines Kaninchen Retikulozytenlysates wurde durch Inkorporation radioaktiver Aminosäuren in endogene Translationsprodukte und anschließender Fraktionierung in einem 15%igen SDS-Gel nachgewiesen (Spur 3a; 3b). Nach Zerstörung der endogenen mRNA (Spur 2a, 2b) konnte das Lysat mit exogener RNA der Maus (1a, 1b) programmiert werden.

2.1.2. Optimierung der in vitro Translation.

Die beiden am häufigsten benutzten zellfreien, Protein synthetisierenden Systeme für eukaryotische RNA sind der Weizenkeimextrakt und das Kaninchenretikulozytenlysat. Als Vorteil des Weizenkeimsystems lassen sich die niedrigen Kosten und der geringe Zeitaufwand für die Präparation solcher Extrakte anführen. Letzteres ist deshalb erwähnens-

wert, weil die biologische Aktivität beider zellfreien Systeme von Präparation zu Präparation einer großen Variabilität unterliegt, und schlechte Lysate oder Extrakte von vornherein zu verwerfen sind. Das Vorhaben, exogene mRNA zu translatieren, wird durch den Weizenkeimextrakt deshalb besonders begünstigt, weil er eine sehr niedrige endogene Translationsaktivität besitzt und somit, ganz im Gegensatz zum Lysat, weitgehend vom Zusatz fremder RNA abhängig ist. Der entscheidende Nachteil besteht in der Tendenz einer vorzeitigen Termination der Translationsprodukte und der Freisetzung der Peptidyl-tRNA. Jedoch soll der Zusatz von Polyaminen wie Spermidin oder Spermin helfen, diese Schwierigkeit durch Stimulation der Elongation zu überwinden (Clemens 1984). Die Gefahr eines vorzeitigen Translationsabbruchs war der ausschlaggebende Grund, weshalb der Weizenkeimextrakt nicht verwendet wurde.

Jedoch auch das Lysat ist nicht ohne Nachteile. So muß bei diesem System eine große Sensitivität gegenüber Inhibitoren (z.B. ds RNA, oxidierte Thiolverbindungen) in Kauf genommen werden, die bisweilen auch durch die jeweilige RNA Präparation miteingebracht werden können. Will man fremde mRNA effektiv translatieren, so ist es unbedingt erforderlich, die endogene mRNA enzymatisch abzubauen. Mit der Mikrokokus-Nuklease läßt sich dies mit eleganter Einfachheit bewerkstelligen (Pelham et al. 1976): das Enzym ist vollständig von Ca^{++} abhängig und kann deshalb nach dem Abbau einzelsträngiger RNA durch den Chelatkomplexbildner EGTA inaktiviert werden. Doch dieser Vorgang muß für jedes Lysat neuarbeitet werden. Eine zu niedrige Konzentration an Mikrokokus Nuklease inaktiviert die endogene mRNA nicht vollständig und wird somit wegen der ausgezeichneten Translationseffizienz von α - und β -Globin mRNA zu hohen "Background"-Werten der Proteinsynthese führen. Zuviel Enzym oder ein zu langer Verdau schädigt die Ribosomen, die t-RNA und führt deshalb zu stark herabgesetzten Aminosäureeinbauwerten, verglichen zum nicht behandelten Lysat. Nicht vergessen werden darf im Verlauf dieser zeitraubenden Vorbereitung die Erstellung

einer Dosis-Wirkungskurve für Hämin am unbehandelten Lysat zur Ermittlung des Optimums der Stimulation. Dank des kommerziellen Vertriebs von Hämin optimierter und mit Mikrokokus-Nuklease behandelter Lysate, lassen sich die Vorarbeiten erheblich abkürzen. Neben der Neueinstellung der Magnesiumkonzentration und der Optimierung der Kaliumkonzentration in Abhängigkeit der jeweils angebotenen mRNA, muß lediglich noch die Sättigungskonzentration der eingesetzten RNA ermittelt werden. Diese Optima werden durch Serien von in vitro Translationen festgestellt, in denen alle Parameter bis auf einen konstant gehalten werden. Nach einer festgelegten Zeitdauer wird die Synthese gestoppt, und der radioaktive Aminosäureeinbau durch TCA-Fällung und Filtration auf Glasfaserfilter bestimmt. Die auf diese Weise meßbare Radioaktivität ist ein Maß für die stattgefundene Proteinsynthese. Der Einfluß von Spermidin auf die in vitro Translation ist in den folgenden Ausführungen nicht untersucht, sondern aus der Literatur (Maniatis et al. 1982a) entnommen worden. In mehreren zellfreien, eukaryotischen Systemen haben Polyamine nicht nur den Bedarf an Magnesiumionen gesenkt, sondern obendrein eine Stimulation bewirkt, die durch keine noch so hohe Mg^{++} Konzentration herbeigeführt werden kann (Watanabe et al. 1981). Zusätzlich erhöhen sie in diesen Systemen die Genauigkeit der Translation (Igarashi et al. 1982) und scheinen in vivo die Stabilität und die Konformation des proteinsynthetisierenden ribosomalen Komplexes zu beeinflussen (Tabor et al. 1982).

2.1.2.1. Optimierung des Ionenmilieus

Die Effizienz der in vitro Proteinsynthese ist, von Fall zu Fall in unterschiedlichem Ausmaß, von der Kationenkonzentration im Inkubationsansatz abhängig. Jede gegebene mRNA sowie jede mRNA-Population besitzt ihre individuelle Dosis-Wir-

kungskurve gegenüber mono- und bivalente Kationen. Amplitude und Form der Kurve variieren beträchtlich. Bei Encephalomyocarditis Virus können Effekte bis zum Faktor 5 gegenüber der variablen Kaliumionenkonzentration beobachtet werden, während im gleichen Ionenbereich die Translationsfähigkeit der mRNA-Population von Maus 3T 3 Zellen sich nur um 100%

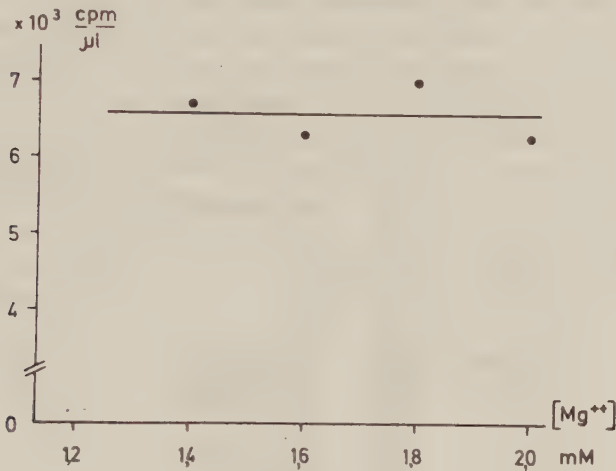


Abb. 2-3: Abhängigkeit der in vitro Translationseffizienz von der Magnesiumkonzentration

mRNA der männlichen Speicheldrüse wurde bei Variation der Mg^{++} -Konzentration in vitro translatiert. Der radioaktive Einbau von ^{35}S -Methionin (angeboten wurden 15µCi) in exogenes Protein wurde nach 2h bei 30°C durch TCA-Fällung ermittelt.

verändern läßt.

Allgemein gilt als Faustregel, daß niedrige K^{+} -Konzentrationen die Translationsinitiation begünstigen, jedoch nur eine schlechte Elongation der Synthese ermöglichen und eine hohe K^{+} -Konzentration zu langen Translationsprodukten führt, wobei allerdings jetzt eine schlechtere Initiation in Kauf genommen werden muß (persönliche Mitteilung von der Helm).

Als Kompromiß wird deshalb im allgemeinen eine Kaliumkonzentration zwischen 60-150mM gewählt. Weniger gravierend sind die beobachtbaren Effekte beim bivalenten Kation Mg^{2+} , welches wirksamer als Ca^{2+} auf die Proteinsyntheserate wirkt (Wynn Jones et al. 1979; Grierson et al. 1983). Sein Optimum wird zwischen 1,2 und 1,8mM angegeben. Als Gegenion sollte bevorzugt für beide Kationen Acetat an Stelle von Chlorid wegen seiner hemmenden Wirkung verwendet werden (Weber et al. 1977). Chloridkonzentrationen über dem physiologischen Wert inhibieren nämlich die Ausbildung des mRNA-Ribosomen Initiationskomplexes (Di Segni et al. 1979).

Die mit der Guanidiniumthiocyanat Methode präparierte mRNA der Speicheldrüse wurde, zwecks Optimierung unter variierenden Ionenbedingungen, für zwei Stunden bei $30^{\circ}C$ in Gegenwart von ^{35}S -Methionin in vitro translatiert. Durch den Zusatz von Natronlauge (siehe Methoden 16.3), die die Peptidyl-tRNA

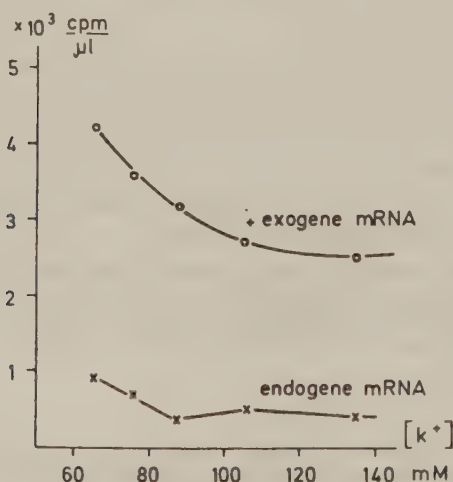


Abb. 2-4: Beeinflussung der in vitro Syntheserate durch die K^{+} -Konzentration.

Der radioaktive Einbau von ^{35}S -Methionin (eingesetzt wurden 10µCi) wurde durch TCA-Fällung bestimmt.

Moleküle hydrolysiert, wurde die Reaktion abgebrochen und so eine Überschätzung der Syntheserate weitgehend verhindert. Was die eingesetzte Magnesiumkonzentration betrifft, so kann keine Korrelation mit der Syntheserate nachgewiesen werden (Abb. 2-3). Im Gegensatz dazu wird ein Zusammenhang zwischen der Kaliumkonzentration und den TCA fällbaren, radioaktiven

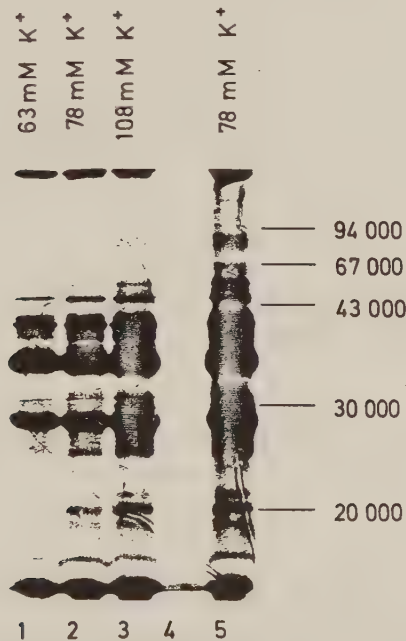


Abb. 2-5: Bestimmung der optimalen K^+ -Konzentration für die Translationselongation.

Die Syntheseprodukte von Maus polyA⁺ RNA wurden nach der in vitro Translation bei unterschiedlichen K^+ -Konzentrationen in einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt. In den Spuren 1-3 wurde die eingesetzte RNA für 90sec bei 70°C denaturiert; eine Hitzedenaturierung bei 90°C verbessert jedoch beträchtlich die Translationseffizienz der mRNA (vergleiche Spur 2 und 5) Spur 4: Mikrokokkus-Nuklease behandeltes Lysat ohne exogene mRNA.

Syntheseprodukten erkennbar, wobei der beobachtbare Effekt jedoch unter 100% liegt (Abb. 2-4). Wegen des meßtechnischen Aufwandes ist nur der wichtigere absteigende Ast der Optimumskurve bestimmt worden, denn wie schon einleitend angesprochen, kommen die hohen cpm-Werte bei niedrigem K^+ vorwiegend durch eine ausgeprägte Translationsinitiation zustande - von Interesse sind aber die vollständigen Genprodukte der mRNA. Zur besseren Analyse dieses Sachverhalts wird am besten das radioaktive Material des Lysates elektrophoretisch im SDS-Gel aufgetrennt und durch anschließende Fluorographie (Chamberlain 1979) beurteilt. Von den drei näher untersuchten Kaliumkonzentrationen erwies sich 108mM als die geeignetste für die Elongation (Abb. 2-5).

2.1.2.2. Korrelation zwischen radioaktiven Einbau und angebotener Menge mRNA

Einer der wichtigsten Parameter, der die Syntheserate beeinflusst, ist der Gehalt an translatierbarer mRNA im Ansatz, der sicher nicht mit der zupipettierten Gesamtmenge an RNA gleichzusetzen ist. Dies geht schon aus der Beobachtung hervor, daß RNA Präparationen ohne Phenol circa 5 mal aktiver in der in vitro Translation sind, als jene die durch Phenolextraktion gewonnen wurden (Raymond et al. 1979). Nur wenn die biologisch aktive mRNA ihr Sättigungslevel erreicht, kann die hohe mehr als 2h andauernde Translationsaktivität des Retikulozytensystems voll zur Wirkung kommen. Andererseits möchte man natürlich mit der kostbaren poly(A)⁺ RNA so sparsam wie möglich umgehen. Hitzedenaturierung oder Behandlung der mRNA mit Methylquecksilber (Payvar et al. 1979) sind hier sehr hilfreiche Maßnahmen, die beim "Sparen" helfen und offenbar den Anteil biologisch wirksam werdender mRNA erhöhen.

Bei abgeschätzten Konzentrationen über 300µg/ml oder über 3µl Maus-mRNA der Vorratslösung pro 10µl in vitro Translationsansatz (letztere Angabe ist vorzuziehen, da sie keinen

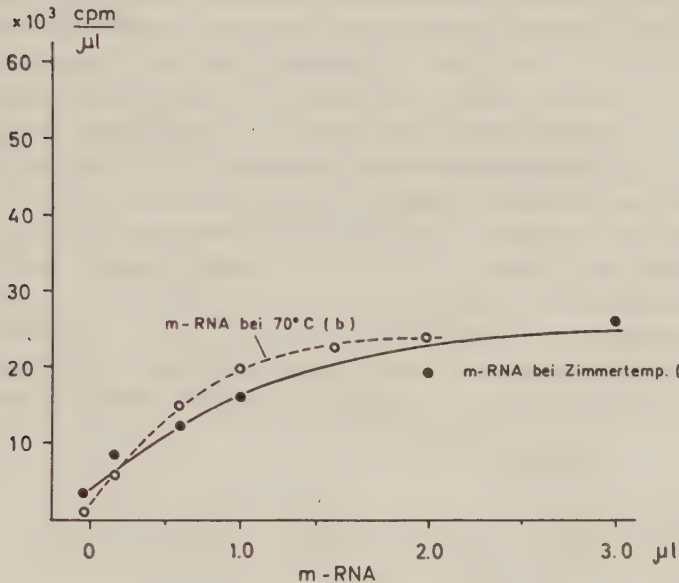


Abb. 2-6: Syntheseleistung der in vitro Translation in Abhängigkeit der angebotenen mRNA-Menge.

Unterschiedliche Mengen an mRNA pro 10µl Inkubationsansatz wurden 2h bei 30°C in vitro translatiert. Der radioaktive Einbau von ³⁵S-Methionin pro µl Ansatz wurde durch TCA-Fällung des Proteins ermittelt (a). Wird die mRNA vor der Translation hitzedenaturiert, so erhöht sich ihre biologische Aktivität (b).

Fehler einschließt) ist offensichtlich mit keiner weiteren kräftigen Steigerung der Translation zu rechnen, was aus dem sich andeutenden asymptotischen Kurvenverlauf (a) (siehe Abb. 2-6) zu folgern ist. Eine kurze thermische Denaturierung (unter Methoden 16.4.) der RNA bei 70°C senkt den Ver-

brauch um ca. 50% bei gleichem radioaktiven Einbau. Wie aus Abb. 2-5 zu entnehmen ist, läßt sich durch die Erhöhung der Denaturierungstemperatur um 20°C die Translationsfähigkeit der zugegebenen RNA noch weiter steigern (vergl. Spuren 2 und 5).- Keinen nennenswerten Einfluß zeigt hingegen der Zusatz von Kalbsleber tRNA auf die Translationseffizienz (Abb. 2-7). Somit ist zu vermuten, daß die Komposition der Retikulozyten tRNA-Population, die in erster Linie auf Kaninchenglobin zugeschnitten ist, recht gut den Anforderungen der Speicheldrüsen mRNA gewachsen ist. Diese gute gegenseitige Abstimmung innerhalb der heterogenen in vitro Translationsmaschinerie ist keine Selbstverständlichkeit, wie sich z.B. an Hand von TMV-Virus mRNA leicht zeigen läßt (Pelham et al. 1976).

Die Optimierung der vier Parameter K^{+} , Mg^{2+} , exogene mRNA- und tRNA-Konzentration sollte bei unabhängiger Überlagerung eine Steigerung der in vitro Translationsrate um mehr als

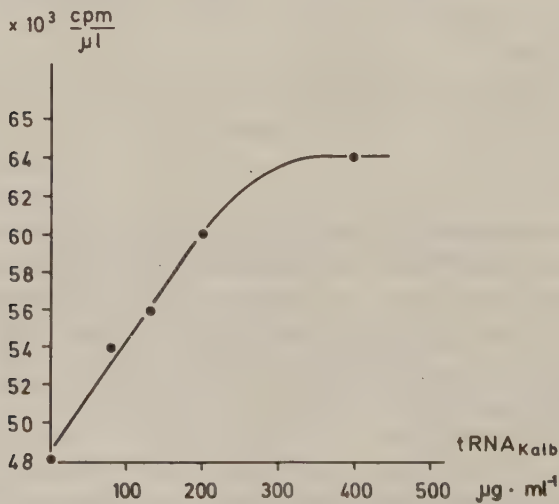


Abb. 2-7: Stimulation der in vitro Syntheseleistung durch Zugabe von exogener t-RNA.

einen Faktor 20, gegenüber der Ausgangssituation, herbeiführen.

Möglicherweise ist dem aufmerksamen Leser nicht entgangen, daß dem verwendeten Isotop bzw. der Wahl der markierten Aminosäure keine Beachtung geschenkt worden ist. Dies trifft nur teilweise zu. Bei der Untersuchung der präparierten Maus

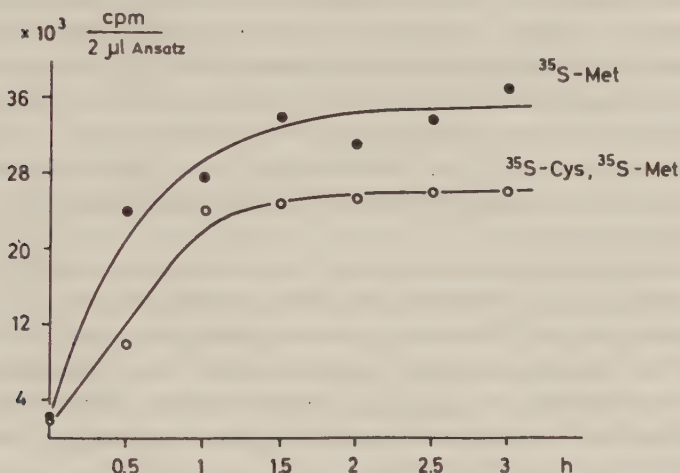


Abb. 2-8: Bestimmung des radioaktiven Einbaus bei Zugabe von ^{35}S -Methionin und ^{35}S -Cystein

Ca. 1 µg poly(A)⁺ mRNA der Glandula vesiculosa des Stiers ist in Gegenwart von 20 µCi Methionin oder 10 µCi Methionin und 10 µCi Cystein 3h lang in vitro translatiert worden. Der Einbau radioaktiver Aminosäuren in TCA präzipitierbares Protein ist in beiden Fällen bestimmt worden.

mRNA auf biologische Aktivität (siehe 2.1.1.) ist sowohl mit ^{35}S -Methionin als auch in einem Parallelansatz mit einer ^3H -Aminosäuremischung (Amersham TRK 550) gleicher Gesamtaktivität, aber mit erheblich niedrigerer spezifischer Radioaktivität, gearbeitet worden. Das Fluorogramm der aufgetrennten Produkte spricht für sich (Abb. 2-2). Wesentlich

später ist, hingegen in Zusammenhang mit einer anderen Fragestellung, die Verwendung von ^{35}S -Cystein für die zellfreie Synthese untersucht worden. Diese Aminosäure sollte für den immunologischen Nachweis von prä-pro-NGF und für die geplante "hybrid-selected translation" geradezu prädestiniert sein, kommen doch schon allein 6 Cysteine im Gegensatz zu einem Methionin in der maturen β -Untereinheit vor. Doch die hohen Kosten und die schwierige Handhabung, bedingt durch äußerst leichte Oxidation, wirken abschreckend. Der zu erwartende erhöhte Einbau von Radioaktivität, bei gleichzeitiger Verwendung von ^{35}S -Methionin und ^{35}S -Cystein, konnte wiederholt nicht nachgewiesen werden (Abb. 2-8), und auch Unterschiede in der Markierung der Translationsprodukte sukrosefraktionierter mRNA (Daten nicht gezeigt) waren nicht feststellbar.

Im nachhinein kann man sagen, daß es richtig gewesen war, alle Energie auf die Optimierung der biologischen Aktivität des zellfreien Systems gesetzt zu haben als auf ^{35}S -Cystein, um die experimentellen Schwierigkeiten des Nachweises von prä-pro-NGF in der in vitro Translation zu überwinden. Die optimalen Translationsbedingungen für die mRNA der Speicheldrüse sind also wie folgt:

108mM K^+
1,6mM Mg^{++}
400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tRNA
500 μM Spermidin

Denaturierung der mRNA bei 90°C für 90sec.

2.2. Antikörper gegen denaturierten NGF binden spezifisch im Translationsansatz ein Protein von 34kD

Eine optimierte zellfreie Proteinsynthese ist für die Identifizierung eines Genprodukts, dessen mRNA mit einer relativen Häufigkeit von $< 0,1\%$ auftritt, eine ganz entscheidende Voraussetzung. Eine relativ schlechte Translationseffizienz der mRNA^{NGF} könnte, den ungünstigsten Fall angenommen, den Anteil im synthetisierten Gesamtprotein noch weiter absenken (Payvar et al. 1979), was den immunologischen Nachweis erheblich erschweren würde. Die Antigen-Antikörper Reaktion muß wegen der Spezifität des Antiserums (siehe 1.3.) mit reduziertem und denaturiertem Protein durchgeführt werden, aber trotzdem darf im Anschluß an diese drastische Behandlung keine Dissoziation und eine damit einhergehende Denaturierung der zugesetzten IgGs in leichte und schwere Ketten durch Spaltung der -S-S-Brücken erfolgen.

Die Reduktion von Protein mit 2-Mercaptoäthanol erfolgt praktisch nicht, genauer gesagt mit sehr kleiner Reaktionsgeschwindigkeit bei Raumtemperatur; erst bei Zufuhr der notwendigen Aktivierungsenergie durch Temperaturerhöhung, im einfachsten Fall durch Kochen, findet eine Reduktion von -S-S-Brücken im Protein statt. Diese Überlegungen finden im Protokoll von Laemmli (1970) für die Proteingelelektrophorese ihre praktische Anwendung. Über Protein A Sepharose gereinigte IgGs wurden für 6h bei Raumtemperatur mit 5% (w/v) 2-Mercaptoäthanol inkubiert und anschließend im SDS-Gel auf ihre Integrität hin untersucht. Wie erwartet, konnte eine nennenswerte Reduktion von -S-S-Brücken und das damit einhergehende Auftreten schwerer (50.000) und leichter Ketten (25.000) nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Denaturierung der Proteine mit SDS (Endkonz. 1,6%) schließt die auf Wasserstoffbrückenbindung basierende Antigen-Antikörper Reaktion aus. Durch die Verdünnung des Puffers und das weitere Abfangen von SDS mit nichtionischem Detergenz, wie z.B. NP 40, kann diese Proteininteraktion

jedoch trotzdem noch zustandekommen. Als günstig für die Micellenbildung hat sich ein Verhältnis von ionischem zu nichtionischem Detergenz von 1:5 herausgestellt (persönliche Mitteilung L. De Gennaro). Pilotexperimente mit jodiertem NGF halfen bei der Optimierung der Inkubationszeiten, der zugesetzten Menge an Antiserum D und an Protein A Sepharose zur Bindung des Immunkomplexes.

Das Antiserum D gegen gelelektrophoretisch gereinigten, denaturierten NGF erkennt unter den zellfrei-synthetisierten Genprodukten der männlichen Speicheldrüse ein Protein von ca. 34kD, sowie einige kleinere Proteine. Letztere müssen jedoch gemäß den negativen Kontrollen (Abb. 2-9) als unspezifisch gelten und können durchaus als Copräzipitate von Haupttranslationsprodukten gedeutet werden. Als weiteres Indiz für die Spezifität der 34kD Bande spricht ihre Kompetierbarkeit mit einem Überschuß an denaturierten NGF (Abb. 2-9 II Spur 3).

Dieser experimentelle Ansatz favorisiert, ebenso wie die früher beschriebenen Immunblots, ein Protein mit ca. 34kD als primäres Translationsprodukt der NGF-Transkriptionseinheit. Durch die zellfreie Synthese des Vorläufers im Retikulozytenlysat ist die Gefahr seiner vorzeitigen proteolytischen Degradierung, die im proteasenreichen Speicheldrüsenhomogenat mit Recht zu befürchten ist und auch wiederholt beobachtet wurde, beträchtlich herabgesetzt worden. Es gibt weder einen Hinweis für die Prozessierung der Vorstufe während der zweistündigen Translation im Retikulozytenlysat, noch für eine Proteolyse während der mehrstündigen Immunreaktionen, die jedoch in Gegenwart von Proteaseninhibitoren durchgeführt wurden (siehe Methoden 16.5). Trotzalledem kann eine partielle Prozessierung des Genprodukts im Lysat, auf Grund der durchgeführten Versuche, nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Um dies Möglichkeit zu prüfen, mußten kinetische Studien mit synchronisierter Translationsinitiation gemacht werden. Aussagekräftiger ist es jedoch, die Sequenz der mRNA zu bestimmen, sie mit den Daten der Immunpräzipitation und der "hybrid-selected translation" zu vergleichen

und auf diesem Wege prä-pro-NGF eindeutig festzulegen.

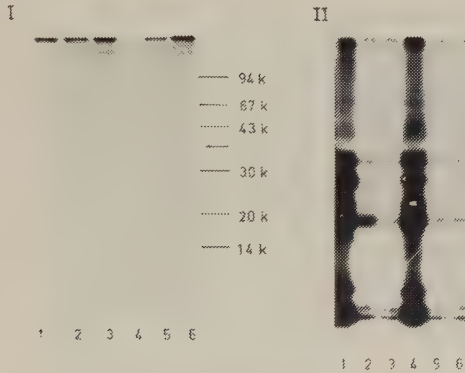


Abb. 2-9: Immunpräzipitation des NGF-Vorläufers von 34kD nach der *in vitro* Translation von poly(A)⁺ RNA der Mausspeicheldrüse

I. Unter optimierten Bedingungen wurde mRNA translatiert (eingesetzt wurden 100µCi ³⁵S-Met) und die Syntheseprodukte mit Antiserum D gegen denaturierten NGF analysiert. Durch Kochen im Laemmli Probenpuffer wurden die an Protein A-Sepharose gebundenen Immunkomplexe eluiert und in einem 12-22 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Präimmunserum D (1); Protein A-Sepharose (2); Antiserum D (3); Immunpräzipitation von 2,5S NGF mit Antiserum D (4); Präimmunserum D (5); Antiserum B (6);

II. Immunpräzipitation mit Antiserum D ohne Denaturierung und Reduktion des *in vitro* Translationsansatzes (1); Denaturierung der Proteine mit SDS und 2-Mercaptoäthanol vor der Immunpräzipitation (2); Immunpräzipitation in Gegenwart von 10µg zugesetzten, denaturierten NGF (3). In den Spuren 4 (ohne SDS), 5 (mit SDS) und 6 (Präimmunserum plus SDS) ist ein Anti-peptid-Serum (Kaninchen 5) gegen eine ausgewählte Sequenz von pro-NGF untersucht worden. Auf diese Weise wurden auch die übrigen Anti-peptid-Seren der Kaninchen 6-9 mit ebenfalls negativen Ergebnis getestet (siehe unter 4.3.)

3. Ermittlung des primären Translationsproduktes von NGF durch Verwendung eines cDNA-Klons

Das Bestreben, ein Antiserum in die Hand zu bekommen, welches den Vorläufer von NGF erkennt, galt nicht allein der Identifizierung desselben, sondern darüber hinaus der Möglichkeit, eine cDNA-Bank nach NGF-Klonen "screenen" zu können. Alternativ kann eine solche Bibliothek auch mit Oligonukleotiden als Hybridisierungsprobe analysiert werden, wobei deren Sequenz sich dann von der bekannten Primärstruktur von NGF ableitet. Die Degenerierung des genetischen Codes bewirkt in den meisten Fällen eine mehrdeutige Zuordnung der Codons zu den einzelnen Aminosäuren des ausgewählten Proteinabschnitts. Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre in aller Welt haben gezeigt, daß es bei kürzeren Oligonukleotiden (ca. 20 Basen) sicherer ist als Hybridisierungsprobe eine Oligonukleotidfamilie, also eine Mischung sämtlicher nach dem genetischen Code in Frage kommender Oligonukleotide, zu verwenden (siehe z.B. bei Reyes und Wallace 1984). Diese Strategie ist für die Isolierung von NGF cDNA-Klonen der Maus erfolgreich angewandt worden (Scott et al. 1983; Ullrich et al. 1983) und hat zur Identifizierung der mRNA mit ca. 1350b und zu deren vollständigen Sequenz geführt (Abb. 3-1). Doch die mRNA für NGF besitzt zwei AUGs (Abb. 3-1 Position 1 und 67), die als potentielle Translationsstarts fungieren könnten und zu recht unterschiedlichen prä-pro-Molekülen mit 33.800 bzw. 25.900D führen würden. Beide Initiationsstellen werden von Scott et al. und Ullrich et al. mit gleichem Nachdruck bis heute verfochten, obwohl beiden Arbeitsgruppen das Schlüsselexperiment in ihrer Argumentation fehlt.- Unbestritten ist, daß NGF ein sekretorisches Protein ist, und sein Vorläufer deswegen an membrangebundenen Polyribosomen synthetisiert wird. Gemäß der Signalthypothese besitzen die sekretorischen Polypeptide eine Signalsequenz, die für ihren cotranslationalen Transport in das endoplasmatische Retikulum notwendig ist (Walter & Blo-

CAGCGCCUGGAGCCGGAGGGGAGCGCAUGGACUUUGGAGCGCCUUAUUAUUGG	59
AUCUCCCCGGGAGCUUUUUGGAAACUCCUAGUGAAC	110
1 met leu cys leu lys AUG CUG UGC CUC AAG	
pro val lys leu gly ser leu gly val gly his gly gln his gly CCA GUG AAA UUA GGC UCC CUG GAG GUG GAC CAC GGG CAG CAU GGU	70 20
gly val leu ala cys gly arg ala val gln gly ala gly trp his GGA GUU UUG GCC UGU GGU CGU GCA GUC CAG GGG GCU GGA UGG CAU	30 200
ala gly pro lys leu thr ser val ser gly pro asn lys gly phe GCU GGA CCC AAG CUC ACC UCA GUG UCU GGG CCC AAU AAA GGU UUU	40 245
ala lys asp ala ala phe tyr thr gly arg ser glu val his ser GCC AAG GAC GCA GCU UUC UAU ACU GGC CGC AGU GAG GUG CAU CAG	60 290
val met ser met leu phe tyr thr leu ile thr ala phe leu ile GUA AUG UOC AUG UUG UUC UAC CUG AUG ACU CGG UUU UUG AUG	70 335
gly val gln ala glu pro tyr thr asp ser asn val pro glu gly GSC GUA CAG GCA GAA CCG UAC ACA GAU AGC AAU GUC CCA GAA GGA	90 380
asp ser val pro glu ala his trp thr gly leu gly phe leu GAC UCU GUC CUA GAA GGC CAC GCG GGU UCU CAG CAG CAG CAG	100 423
asp thr ala leu arg arg ala arg ser ala pro thr ala pro ile GAC ACA GGC CUC GGC AGA GCC GCG AGU GCC CCU CAC GCA CCA AUA	120 470
ala ala arg val thr gly gln thr arg [asn ile thr] val asp pro GCU GCC CGA GUG ACA GGG CAG ACC CGC AAC AUC ACU GUA CAC CGC	130 515
arg leu phe lys lys arg arg leu his ser pro arg val leu phe AGA CUG UUU AAG AAA CGG AGA CUC CAC UCA CCC CGU GUG CUG UUC	150 560
ser thr gln pro pro pro thr ser ser asp thr leu asp leu asp AGC ACC CAG CCU CCA CCC ACC UCU UCA GAC ACU CUG GAU CUA GAC	160 605
phe gln ala his gly thr ile pro phe [asn arg thr] his arg ser UUC CAG GCC CAU GGU ACA AUC CCU UUC AAC AGG ACU CAC CGG AGC	180 650
lys arg ser ser thr his pro val [phe his met gly] glu phe ser AAG CGC UCA UCC ACC CAC CCA GUC CUC CAC AUG GGG GAG UUC UCA	200 695
val cys asp ser val ser val trp val gly asp lys thr thr ala GUG UGU GAC AGU GUC AGU GUG UUG GGU GAU AAG ACC ACA GCC	210 740
thr asp ile lys gly lys gly val thr val leu ala glu val asn ACA GAC AUC AAG GGC AAG GAG GUG ACA GUG CUG GCC GAG GUG AAC	220 785
ile [asn asn ser] val phe arg gln tyr phe phe glu thr lys cys AUU AAC AAC AGU GUA CAG AGA CAG UAC UUU UUU GAG ACC AAG UGC	240 830
arg ala ser asn pro val glu ser gly cys arg gly ile asp ser CGA GCC UCC AAU CCU GUU CAG AGU GGG UGC CGG GCC AUC CAC UCC	250 875
lys his trp asn ser tyr cys thr thr his thr phe val lys AAA CAC UGG AAC UCA UAC UGC ACC ACG ACU CAC ACC UUC GUC AAG	270 920
ala leu thr thr asp glu lys gln ala ala trp arg phe ile arg GCG UUG ACA ACA GAU GAG AAG CAG GCU GCC UGG AGG UUC AUC CGG	280 965
ile asp thr ala cys val cys val leu ser arg lys ala thr arg AUA GAC ACA GCC UGU GUG UCU GUG CUC AGC AGG AAG GCU ACA AGA	300 1010
arg gly 3P AGA GGC UGA CUUGCCUGCAGCCGCCUCCCCUCCGCCUCCACACUCUCUGGG	1067
CCCCUCCUACCCUAGCCUGUAAUUAUUUUUAAUUAUUAAGGACUGCAUGAAUUUUUAC	1127
GUUUUAUCAAUUUUUAAAGACAUAUUUUUUAUUUUUUAAGCAUCCUGAAAAA	

Abb. 3-1: Sequenz von prä-pro NGF

Die vorgeschlagenen Translationsinitiationsstellen sind die Methionine an Position 1 und 67. Die zugehörigen potentiellen Ribosomembindungsstellen sind unterstrichen und die hydrophoben Regionen der Signalpeptide sind eingerahmt. Unterlegt ist die Sequenz eines synthetischen Peptids, gegen welches Antikörper erhoben wurden. Punktirt, in eckigen Klammern stehen potentiellen N-Glykosylierungssignale. Die kodierende Oligonukleotidfamilie zu gln tyr phe phe thr (gestrichelt herausgehoben) diente J.Scott zur Isolierung des spezif. NGF-Klons.

bel 1982). Abgesehen von ein paar Ausnahmen befindet sich diese Erkennungssequenz am N-Terminus des Proteins auf einem sogenannten Signalpeptid (prä), welches im allgemeinen unmittelbar nach seinem Durchtritt durch das ER abgetrennt wird (Hortin et al. 1983). Die Sequenz dieser bis zu 30 Aminosäuren langen Signalpeptide ist nicht konserviert (Anhang A-3), sondern zeichnet sich gewöhnlich nur durch einen intern gelegenen, hydrophoben Bereich aus, den das im Zytoplasma lokalisierte "signal recognition particle" erkennt. Durch seine Bindung wird die weitere Proteinsynthese blockiert. Interagieren diese in ihrer Elongation gehemmten Polysomen mit dem "docking protein" (SRP-Rezeptor), einem Membranprotein des ERs, so wird die Translation reaktiviert, und die naszierende Polypeptidkette erreicht vektoriell gerichtet das Lumen des ERs (Walter et al. 1981; Meyer et al. 1982).

Gegen den 33,8kD-Vorläufer spricht sein ausgesprochen atypischer Aminoterminus, der keine hydrophobe Region erkennen läßt; ganz im Gegensatz dazu steht der kleinere Vorläufer, dessen Signalpeptidkandidat sich ohne Schwierigkeiten in die Auswahl der bekannten prä-Sequenzen einreihen ließe (A-3). Für den Translationsstart am ersten Methionin spricht seine nähere Position an der "cap site" der mRNA (Kozak 1981) sowie die unter Abschnitt 1.3. und 2.2. dargestellten Befunde. Jedoch könnten prinzipiell, nach dem derzeitigen lückenhaften Verständnis der Proteininitiation, beide AUGs das Startcodon bilden, liegen sie zudem auch beide noch in einer Haarnadelschleife vergleichbarer Stabilität (Tinoco et al. 1973), in der Nachbarschaft einer potentiellen Ribosomenbindungsstelle (A-4). Solche Sekundärstrukturen sind bei einer Reihe von mRNAs nahe der Initiationstelle gefunden worden, und man spekuliert auf einen Zusammenhang mit der Translationsinitiation (Lomedico et al. 1979), der aber, wie man mittlerweile weiß, keinesfalls eine absolute Notwendigkeit für eine erfolgreiche Translationsinitiation darstellt. Eine Klärung dieser umstrittenen Initiationsstelle kann mit Techniken erreicht werden, wie der "hybrid-selected transla-

tion" oder der zellfreien Transkription und Translation der prä-pro-NGF Sequenz unter Zuhilfenahme des SP6 Systems, welches jedoch einen kompletten cDNA-Klon voraussetzt (Krieg und Melton 1984).

3.1. In vitro Translation hybridselektierter mRNA von prä-pro-NGF

An Filter gebundene, klonierte cDNA kann durch Hybridisierung mit poly(A)⁺ RNA dazu benutzt werden, die zugehörige mRNA aus dem Pool herauszufischen. Nach dem Ablösen der spezifischen mRNA vom Filter, der aus Nitrozellulose oder Diazophenylthioäther Papier (Seed 1982) bestehen kann, läßt sie sich mit einer stark herabgesetzten Effizienz in vitro translatieren. Auf diese Weise kann jedem isolierten cDNA Klon sein Translationsprodukt zugeordnet werden (Ricciardi et al. 1979). Die Empfindlichkeit dieses experimentellen Ansatzes wird mit 0,1 ng biologisch aktiver mRNA angegeben (Maniatis et al. 1982 b) und sollte theoretisch ausreichen, die mRNA von NGF bei einem noch praktikablen Verbrauch an poly(A)⁺ RNA nachzuweisen. Da nur noch 10-30% der abgelösten RNA biologische Aktivität besitzt (Maniatis et al. 1982 b), müssen für die Hybridisierung mindestens 1 µg mRNA (0,1 ng · 10 · 1000) aus der Mausspeicheldrüse eingesetzt werden. Zur Sicherheit und zur Erhöhung der spezifischen RNA-Konzentration wurde das 15-fache der kalkulierten Mindestmenge an poly(A)⁺ RNA eingesetzt. Die Nitrozellulose mit 9 mm² Fläche wurde zur Verbesserung der Rate der Hybridisierungsreaktion bis zu ihrer maximalen Bindungskapazität mit pMN-DNA (cDNA^{NGF} Scott et al. 1983) beladen. Die Hybridisierung erfolgte bei drei unterschiedlichen Temperaturen über Nacht, die unter Berücksichtigung des abgeschätzten T_m = 60°C (siehe Methoden 16.6) ausgewählt wurden. Die Stringenz der Waschung der Fil-

ter war in allen drei Fällen identisch. Die gebundene RNA wurde in Gegenwart von Leber tRNA durch Hitze eluiert und zur Programmierung des Retikulozytenlysats verwendet (Abb. 3-2). Nur bei der Hybridisierungstemperatur von 37°C sieht man im Fluorogramm des Proteingels, deutlich vor dem Hinter-

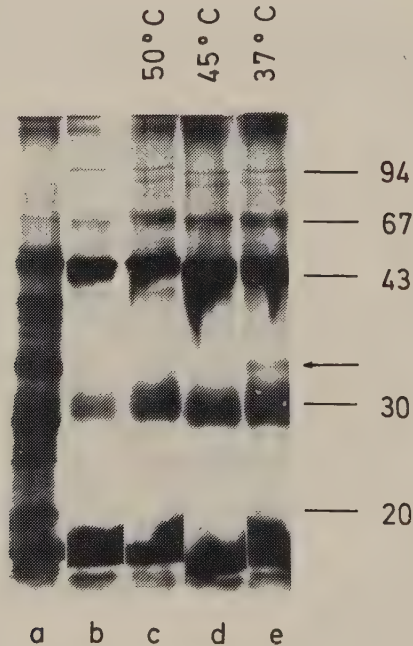


Abb. 3-2: Bestimmung des primären Translationsprodukts des NGF-Gens durch "hybrid-selected Translation"

Filtergebundene klonierte cDNA^{NGF} wurde mit poly(A)⁺ RNA der männlichen Speicheldrüse hybridisiert. An den Filter gebundene RNA wurde eluiert und im Retikulozytenlysats mit 100µCi ³⁵S-Met in vitro translatiert. Spur a: männliche mRNA; b: Lysat ohne exogene RNA; c,d,e: selektierte RNA nach Hybridisierung bei 50°C, 45°C und 37°C. Prä-pro-NGF hat bei dieser Abschätzung eine Größe von knapp 34kD.

grund endogener Translationsprodukte, als zusätzliches Produkt prä-pro-NGF mit einer abgeschätzten relativen Molekularmasse von ca. 34.000. Somit wird zweifellos das erste AUG Codon der mRNA^{NGF} als Start im Retikulozytenlysat benutzt, und eine Instabilität des primären Translationsprodukts durch endogene bzw. cotranslatierte Proteasen (siehe 2.2.) kann ausgeschlossen werden, weil der durch die Sequenz exakt kalkulierbar gewordene Vorläufer mit dem experimentellen Befund im Einklang steht.

3.2. Vergleich der immunologisch nachgewiesenen Vorläufer mit den Prozessierungssignalen der cDNA^{NGF}

Das wichtigste Regulationsprinzip im Prokaryonten ist das Operon mit seiner polycistronischen mRNA. Dieses ermöglicht die simultane Expression individueller Proteine eines bestimmten Gensatzes und gewährleistet so die Ausprägung eines gewissen Phänotyps. Der Eukaryont hingegen bedient sich monocistronischer Moleküle, sollte also eigentlich auf die Synthese mehrerer Proteine als Folge eines singulären Transkriptionseignisses verzichten müssen. Durch das Auftreten von Polyproteinen, die zusätzlich noch gewebsspezifisch prozessiert werden können, kann jedoch bis zu einem bestimmten Grad das polycistronische Prinzip nachgeahmt werden. Anfänglich bei eukaryotischen Viren entdeckt, sind heute eine ganze Reihe zellulärer Polyproteine bekannt, die vorwiegend in irgendeinem Bezug zum neuroendokrinen System stehen (siehe z.B. Douglass et al. 1984). Eines der bekanntesten Polyproteine ist das Proopiomelanocortin (POMC). Nicht nur in diesem Vorläuferprotein sind die darin enthaltenen, bekannten Polypeptidhormone am N- und C-Terminus von einem Paar basischer Aminosäuren (Lys-Lys; Lys-Arg; Arg-Arg) flankiert, sondern diese durch Trypsin spaltbaren Stellen hat man auch in anderen Systemen (Noda et al. 1982; Kakidani

et al. 1982; Amara et al. 1982 etc.) nachweisen können und betrachtet sie als potentielle Prozessierungssignale der Polyproteine. In der cDNA^{NGF} findet man mehrere solche di- bzw. tetrabasische Spaltstellen, die u.a. auch die NGF-Sequenz einrahmen (Abb. 3-1). Eine Proteolyse an Arg-Arg 115-116 und an Lys-Lys- Arg-Arg 144-147 würde laut der Sequenzdaten zu zwei NGF-haltigen intermediären Vorstufen von M_r 22.000 und 18.000 führen. Tatsächlich konnten beide auf Proteinebene im Homogenat der Speicheldrüse nachgewiesen werden (Berger et al. 1977 und 1.3.2.), wenn damit auch noch lange nicht die Beteiligung dieser Erkennungssignale an der in vivo Prozessierung des Vorläufers im Gewebe bewiesen ist. Für den im Immunblot aufgefundenen pro-NGF 28.000D läßt sich kein Pendant in der DNA-Sequenz finden. Er ist vermutlich das Abbauprodukt der 33,8 oder der 30,8kD Vorstufe und entsteht als Artefakt während der Homogenisierung des proteasenreichen Speicheldrüsengewebes. Überraschend ist die Nachweisbarkeit einer 34kD Vorstufe im Gewebe (Abb. 1-7); sie sollte laut der Signalthypothese nicht auffindbar sein, weil das Signalpeptid noch während des cotranslationalen Transportes, also noch vor Fertigstellung des Proteins oder spätestens kurz danach, abgespaltet wird. Dieser Widerspruch läßt sich ausschalten, wenn man einen nicht abspaltbaren Aminoterminus für das 34kD Protein fordert, also eine Situation postuliert, die vergleichbar ist mit Ovalbumin (Meek et al. 1982). Eine endgültige Entscheidung dieser Frage läßt sich jedoch nur durch in vitro Translationsexperimente in Gegenwart von Mikrosomen und anschließender Edman Sequenzierung des Aminoterminus erzielen.

4. Gewinnung von Antikörpern, die gegen ein Peptid der pro-NGF Sequenz der Maus gerichtet sind.

Mit der unter 1.2. beschriebenen Strategie der Immunisierung von Kaninchen mit denaturiertem NGF ist es gelungen, reproduzierbar Antiseren zu erhalten, mittels derer der Vorläufer von NGF immunpräzipitiert werden konnte. Diese spezielle Form der Applikation stellt eine erhebliche Verbesserung gegenüber der Immunisierung einer großen Zahl von Kaninchen mit NGF in 0,02% Essigsäure dar, von denen höchstens das eine oder andere Tier nach dem Zufallsprinzip ein Antiserum produziert, welches Bindungsaffinität zu einer der höhermolekularen Vorstufen von NGF besitzt (Darling et al. 1983). Eine solche Vorgehensweise führt aber keineswegs immer zum gewünschten Erfolg wie die Mißerfolge bei der Immunpräzipitation von prä-pro-NGF in entsprechend programmierten Retikulozytenlysaten deutlich machen (Dicou et al. 1984). Wie unter Abschnitt 2 beschrieben gelang es zwar, unter speziell ausgearbeiteten Bedingungen, die in vitro synthetisierte NGF-Vorstufe immunologisch nachzuweisen, doch die verwendeten Antiseren erkennen auch maturen NGF. Diese Beobachtung sowie eine gewisse Unspezifität im Immunblot macht ihre zuverlässige Anwendung, beispielsweise für die Messung der NGF-Vorstufe im Gewebe, in einem empfindlichen zweiseitigen Enzymimmunttest unmöglich (Korsching et al. 1983). Da das Vorläuferprotein als Immunogen nicht zur Verfügung steht, bietet sich alternativ zur bakteriellen Expression eines Fusionsproteins die Möglichkeit an, aus der cDNA Sequenz der aminoterminalen Extension ein Peptid auszuwählen, das nach gewissen Voraussagen antigene Determinanten des Vorläufers tragen sollte. Die Kopplung des chemisch synthetisierten Peptids an ein Trägerprotein verhindert nach der Applikation seine vorzeitige Eliminierung aus dem Plasma des Tieres und kann zur Gewinnung von spezifischen Antikörpern gegen die native pro-NGF Proteinregion führen. Mit

Antipeptid-Seren gelang es schon mehrfach mit Erfolg, Antikörper beispielsweise gegen virale Proteine zu produzieren (Walter et al. 1980; Lerner et al. 1981) oder nicht identifizierten Leserahmen, das zugehörige Genprodukt zuzuordnen (Mariottini et al. 1983).

4.1. Voraussagen antigener Determinanten des Vorläufers aus der Aminosäuresequenz

Trägt man sich mit dem Gedanken, gegen ein Protein nur auf Grundlage seiner Aminosäuresequenz Antikörper herzustellen, so sollte man zuerst einmal als das Wichtigste eine Region dieses Proteins auswählen, die sich nach ihrer Kopplung an ein Trägerprotein voraussichtlich als immunogen erweisen wird und zu Antikörpern führt, die das intakte, native Protein erkennen. Dabei müssen Regionen nicht notwendigerweise im Protein immunogen sein, um dennoch als Peptid appliziert, erfolgreich Antikörper gegen das Polypeptid hervorzurufen (Deppert et al. 1982). Bei der Auswahl der entsprechenden Sequenz ist von Vorteil, auf Bereiche im Protein zu vertrauen, die polare Charakter besitzen, da sie sehr wahrscheinlich an der Oberfläche des Makromoleküls nach dessen Faltung zu liegen kommen (Kauzmann 1959) und damit voraussichtlich für Antikörper zugänglich sein werden. Das Auffinden dieser polaren Regionen in der Proteinsequenz wird heute durch die Analyse mit dem Computer sehr erleichtert. Es gibt eine Vielzahl solcher Programme, die alle im wesentlichen sehr ähnlich arbeiten. Die zwanzig Aminosäuren sind entweder in eine Hydrophilizitäts- oder in eine Hydrophobizitätsskala eingeteilt, und die Sequenz des Proteins wird fortschreitend vom Aminotermius zum Carboxyterminus gemäß der Bewertungsskala beurteilt, wobei der jeder Aminosäure zugeordnete Index den Durchschnitt aus 5-9 unmittelbar benachbarten Resten darstellt. Für die prä-pro-NGF Sequenz der Maus ist im wesentlichen nach diesem Prinzip durch

Anwendung der inversen Bewertungsskala von Hopp und Woods (1981) ein Hydrophobizitätsprofil erstellt worden (Abb. 4-1) Markant treten die Prozessierungsstellen als "Täler" im Kurvenverlauf hervor, was gleichbedeutend ist mit einem hydrophilen Bereich, während das Signalpeptid des postulierten 26kD Proteins sich als ausgesprochen hydrophobe Region des gesamten Proteins hervortut. Die Studien von Hopp und Woods machen deutlich, daß nicht alle antigenen Determinanten mit hydrophilen Regionen zusammenfallen und umgekehrt, nicht alle hydrophilen Bereiche konsequent antigene Determinanten des nativen Proteins darstellen, aber nichtsdestotrotz häufig als Peptidantigene zum gewünschten Erfolg geführt haben.

Neben der Untersuchung zur Polarität können auch Betrachtungen zur Sekundärstruktur bei der Suche nach einer passenden Sequenz hilfreich sein. Eine ganze Reihe von Untersuchungen legt nahe, daß die Konformation antigenener Determinanten als Folge der Primärstruktur des Antigens erkannt wird und nicht die Sequenz per se (Sachs et al. 1972; Arnon et al. 1969; Arnon et al. 1971). Somit genügt es also nicht, Sequenzen an der Proteinoberfläche aufzuspüren, sondern es macht Sinn jene auszuwählen, die im Protein eine möglichst stabile Sekundärstruktur ausbilden, z.B. eine α -Helix, von der man hoffen kann, daß sie stabil genug ist, um sich auch im entsprechenden trägergekoppelten Peptid auszubilden (Paff et al. 1982). Konträre Überlegungen hierzu bevorzugen Regionen, von denen man eine gewisse atomare Beweglichkeit im Protein erwarten darf (Trainer et al. 1984). In diesem Fall, so die Vorstellung, könnten auch Antikörper gegen Konformationen, die ähnlich aber nicht identisch mit der nativen Konformation sind, quasi in einem mehrstufigen Prozess binden: anfänglich wäre die Protein-Protein-Interaktion schwach und könnte dann durch eine Antikörper induzierte Konformationsänderung des Epitops erstarken. Voraussagen von Sekundärstrukturen können nach Chou und Fasman (1973; 1978) vorgenommen werden. Die in Abb. 3-1 grau unterlegte Sequenz ist nach drei Kriterien ausgewählt worden:

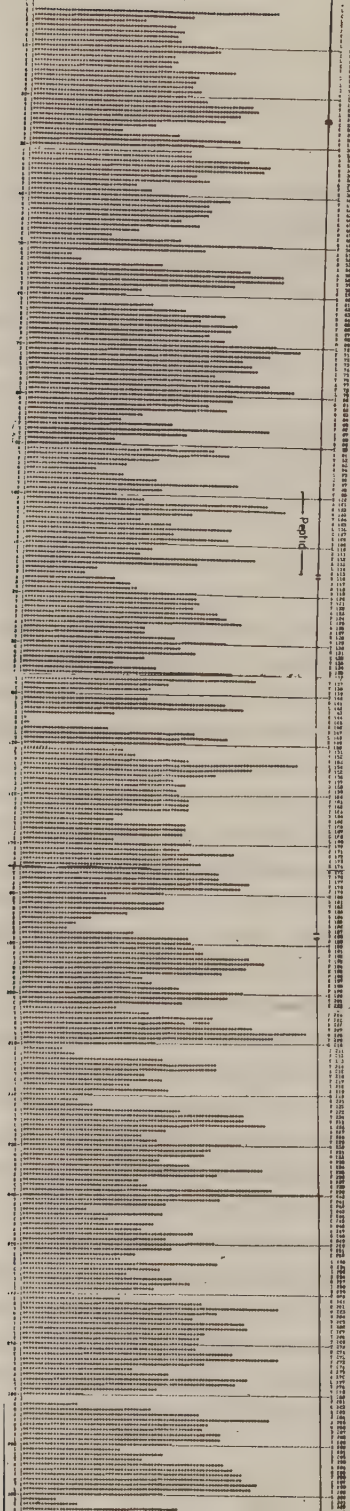


Abb. 4-1: Hydrophobizitätsprofil von prä-pro-NGF

Die zwanzig Aminosäuren werden nach einer Hydrophobizitätsskala beurteilt, die invers zur Bewertungsskala von Hopp und Woods (1981) ist. Der jeder Aminosäure zugeordnete Index im Protein ermittelt sich aus 5 benachbarten Resten. (Das Profil wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Schulz zur Verfügung gestellt.)

- sie ist unmittelbar neben einer potentiellen Prozessierungsstelle, und es besteht somit eine gute Chance, daß die Sequenz für Antikörper zugänglich ist.
- sie stellt nach dem Hopp und Woods Verfahren einen hydrophilen Bereich dar.
- nach Chou und Fasman läßt sich eine stabile α -Helix voraussagen, die nach innen hydrophoben und nach außen hydrophilen Charakter aufweist (persönliche Mitteilung R.Heumann).

4.2. Immunisierung von Kaninchen mit einem Peptid der pro-NGF Sequenz

Das ausgewählte siebzehner Peptid wurde von der Firma Bachem in der Schweiz synthetisiert, und die Sequenz wurde mit dem Edman Abbau überprüft. Als gängige Kopplungsprozedur bietet sich zum einen die Glutaraldehydmethode an (Kagan und Glick 1979), die Aminogruppen mit Aminogruppen verknüpft, zum anderen die Carbodiimidmethode (Hoare und Koshland 1967) für die Kopplung von Carboxylgruppen an Aminogruppen. Als Trägerprotein hat sich vielfach BSA bewährt (Walter et al. 1983), aber auch Hämocyanin der Napfschnecke (KLH), Ovalbumin, Myoglobin etc. haben gleichfalls zu guten Erfolgen geführt; bei KLH besteht jedoch häufig die Tendenz, als Peptid-KLH während der Kopplung zu präzipitieren (Walter et al. 1983). Entscheidet man sich wie auch hier für BSA, so sollte man ein sehr sauberes Präparat verwenden, weil die Verunreinigungen im BSA sich als sehr immunogen erwiesen haben. Der molare Überschuß von Peptid zu BSA kann offenbar beliebig zwischen 4 und 30 eingestellt werden (Walter et al. 1983). Die Konjugation des pro-NGF Peptids an BSA wurde in einer 1-Stufenreaktion über Nacht parallel mit beiden Kopp-

lunsreagenzien bei 10-fachem molaren Überschuß an Peptid durchgeführt; anschließend wurden die Konjugate gegen physiologische Kochsalzlösung dialysiert. Insgesamt wurden neun Kaninchen für die Immunisierung verwendet; jeweils dreien wurde identisches Antigen injiziert, um Tiere mit schlechter Immunantwort ausschließen zu können. Um möglicherweise koppelungsspezifische Effekte bei der Immunantwort besser feststellen zu können, wurde freies Peptid, Glutaraldehyd konjugiertes und Carbodiimid gekoppeltes BSA-Peptid appliziert. Die Dosis pro Tier lag für die Erstimmunisierung bei 100 bis 150µg Peptid, und die Kaninchen wurden bis zu 6 Monaten mit individuell abgestimmten Mengen geboostet, weil über diesen Zeitraum hinweg mit einer Verbesserung der Antikörperproduktion gerechnet werden kann.

Die Antiseren lassen sich sehr schnell qualitativ und wenn nötig auch quantitativ mit einem Enzymimmuntest (EIT) auf ihre Kreuzreaktion mit Peptid prüfen. Hierzu wird das Peptid am besten an ein anderes Trägerprotein konjugiert, im hier beschriebenen Fall wurde Myoglobin verwendet, und auf kleine Nitrozellulosefilter aufgebracht. Anschließend werden die Filter mit den verdünnten Antiseren der Tiere inkubiert, nicht gebundenes Protein wird abgewaschen, und der am Filter anhaftende Antigen-Antikörper Komplex wird mit einem kommerziell erhältlichen Antikörper gegen die Immunglobuline des immunisierten Tieres überschichtet. Der zweite Antikörper ist mit einem Enzym z.B. Peroxidase gekoppelt, und der Umsatz des löslichen, farblosen Enzymsubstrats Chloronaphtol zum farbigen Präzipitat zeigt die Gegenwart gebundener peptidspezifischer Antikörper an. Mit diesem Verfahren sind die Antiseren aller Kaninchen überprüft worden. Im EI-Test ist dabei Glutaraldehyd vernetztes Konjugat eingesetzt worden (siehe Abb. 4-2 oben). Die Antiseren der Tiere 1 - 3, denen nur Peptid injiziert wurde, erkennen erwartungsgemäß weder BSA noch Myoglobin; nur Kaninchen 2 aus dieser Gruppe zeigt eine spezifische, aber relativ schwache Immunreaktion mit dem gekoppelten Peptid. Das Blut der Tiere 5 und 6 besitzt Antikörper gegen das Trägerprotein BSA, gegen das applizier-

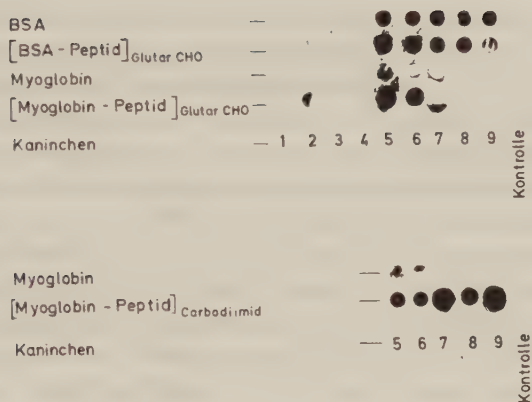


Abb. 4-2: Kaninchen Antiseren gegen gekoppeltes Peptid der prä-pro-NGF Sequenz

Mit einem Enzymimmunttest wurden die 1:100 verdünnten Antiseren der Kaninchen auf Kreuzreaktion mit an Myoglobin gekoppeltes Peptid getestet. Den Tieren wurde freies Peptid (1-3), mit Glutaraldehyd an BSA gekoppeltes Peptid (4-6) und mit ECDI an BSA konjugiertes Peptid (7-9) appliziert. Die Anti-peptid-Seren der Kaninchen 7, 8 und 9 erkennen nur Carbodiimid gekoppeltes Peptid (siehe unten). Als negative Kontrolle diente das Präimmunserum von Kaninchen 5.

te Konjugat und gegen das Kopplungsprodukt Myoglobin-Peptid. Die Antiseren, die gegen Carbodiimid gekoppeltes Peptid erhoben wurden, erkennen selbstverständlich wiederum BSA, nicht aber mit Glutaraldehyd gekoppeltes Peptid (Abb. 4-2 oben). Dieses Resultat kann entweder bedeuten, daß alle diese Tiere (7,8,9) keine Antikörper gegen das Peptid gebildet haben, oder was naheliegender erscheint, nur mit Carbodiimid gekoppeltes Peptid an einem Träger erkennen, nicht aber frei in der Lösung flottierendes Antigen. Diese letztere Vermutung fand in zwei weiteren Immuntests ihre experimentelle Bestätigung (Abb. 4-2 unten). Nur die Antiseren der Kaninchen 2,5 und 6 können offensichtlich freies Peptid binden (Abb. 4-3). Dies ist zumindest die einzige plausible

Erklärung für das Ausbleiben des Signals im Enzymimmunttest nach der Präinkubation der Antiseren mit Peptid. Als positive Kontrolle für diese Manipulation kann das konträre Ergebnis aus Abb. 4-3 mit den Tieren 7,8 und 9 angesehen werden. Die nach vier Wochen erreichten Titer der Kaninchen 5 und 6 lagen rund eine Größenordnung höher als von Kaninchen 2 und sind mit Werten von 1:1000 bzw. 1:3000 recht typisch für Anti-peptid-Seren (Lukas et al. 1983). Die Booster-Injektionen im Anschluß an die erste Serie (siehe Methoden Pkt.9) bewirkten keine weitere Steigerung der Antikörperkonzentration, sondern lediglich der Immunglobulinspiegel konnte über eine lange Zeitspanne annähernd gleichbleibend aufrechter-

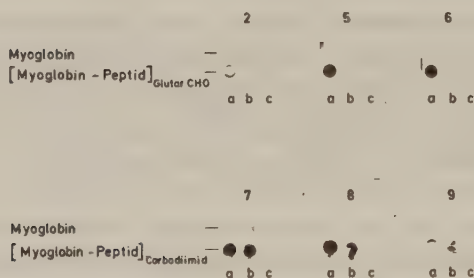


Abb. 4-3: Überprüfung der immunologischen Kreuzreaktion der Anti-peptid-Seren mit ungekoppeltem Peptid

Die Antiseren wurden, dem Titer der Tiere entsprechend, verdünnt: 1:50 (Tier 2); 1:1000 (Tier 5); 1:3000 (6); 1:1000 (7,8,9). Der Enzymimmunttest wurde mit diesen verdünnten Antiseren (a), mit verdünnten Antiseren, die über Nacht mit 200ug/ ml Peptid präinkubiert worden waren (b) und mit Prä-immunserum (c) durchgeführt. Für die Tiere 2, 5 und 6 wurde das im Test verwendete Peptid mit Glutaraldehyd an Myoglobin gekoppelt, während für die Kaninchen 7, 8 und 9 Carbodiimid gekoppeltes Material eingesetzt wurde.

halten werden. Interessanterweise konnte jedoch bei Tieren mit Carbodiimid gekoppelten Antigen durch eine Verringerung der Konzentration an Kopplungsreagenz die Spezifität der Antikörper verändert werden. So reagierte z.B. das Antiserum des Tieres 8 nach drei weiteren Booster-Injektionen mit Glutaraldehyd vernetzten Myoglobin-Peptid Konjugat.

4.3. Prüfung der Antiseren auf Kreuzreaktion mit dem nativen Protein

Wie oben aufgezeigt besitzt das ausgewählte Peptid recht gute immunogene Eigenschaften, und die gewonnenen Antiseren sind in der Lage, das flottierende Peptid zu erkennen. Als letztes blieb noch festzustellen, ob unter den peptidspezifischen Antikörpern eine Subpopulation mit ausreichender Bindungsaffinität zum nativen Protein existiert. Die einzige Möglichkeit, diesen Nachweis ohne größeren technischen Aufwand zu erbringen, bestand in der Immunpräzipitation des Proteins nach der in vitro Translation von mRNA aus der männlichen Speicheldrüse. Alle Anti-peptid-Seren der Kaninchen 4-9, die gegen gekoppeltes Peptid erhoben wurden und das Antiserum 2 gegen freies Peptid erkannten mit diesem Test in vitro synthetisierten prä-pro-NGF nicht (Abb. 2-9 II Spuren 4,5,6). Entweder reicht die Affinität der einzelnen Antiseren nicht aus, die äußerst geringen Mengen an Vorläufer zu binden oder aber wider dem Auswahlkriterium kommt keine der in Lösung angenommenen Konformationen des Peptids der nativen Konformation der entsprechenden Proteinregion nahe genug, um eine stabile Antigen-Antikörper Interaktion einzuleiten (Tainer et al. 1984).

5. Klonierung des Nervenwachstumsfaktors des Rindes

Die Sequenzierung der cDNA von Maus prä-pro-NGF hat zu dem unerwarteten Resultat geführt, daß eine Extension von 187 Aminosäuren am Aminotermus von NGF den Vorläufer im wesentlichen ausmacht, während die carboxyterminale Extension aus den beiden Resten Arg-Gly besteht. Die Datenverarbeitung konnte bisher keine Homologie zwischen dieser zusätzlichen Sequenz und irgendeiner anderen bekannten Sequenz nachweisen (Scott et al. 1983), die pro-Sequenz des menschlichen NGFs (Ullrich et al. 1983) natürlich ausgenommen. Die auffällige Konservierung dieser pro-Sequenzen bei Maus und Mensch läßt durchaus eine funktionelle Rolle vermuten, die über einen gemeinsamen Prozessierungsmechanismus hinausreichen könnte. Diese Theorie läßt sich möglicherweise durch Sequenzvergleich mit anderen Spezies weiter ausbauen. Die bereits angesprochene Klonierung des menschlichen NGF-Gens und die Aufklärung der Primärstruktur seiner kodierenden Abschnitte hat die große Konservierung dieses Proteins (90%) Mensch und Maus aufgezeigt. Konträr zu diesem Befund stehen die ausgeprägten immunologischen Unterschiede der isolierten Nervenwachstumsfaktoren von Maus und Rind. So läßt sich, um nur eine Beobachtung hierfür anzuführen, mit einem Antiserum gegen Rinder NGF, ganz im Gegensatz zum Antiserum gegen Maus NGF, in Ratte nur eine unvollständige Immunsympathektomie erzielen. Dies wird erkennbar am Überleben eines großen Anteils des sympathischen Nervensystems und am Ausbleiben der kompensatorischen Aktivierung des Nebennierenmarks. Deshalb wurde aus diesem und anderen Versuchsergebnissen geschlossen, daß dem Mäuse NGF eine ausgeprägte antigene Determinante des Rinder NGFs fehlt (Harper et al. 1983). Durch die DNA-Sequenzierung von Rinder NGF kann relativ schnell entschieden werden, ob diesem immunologischen Unterschied eine ausgeprägte Veränderung in der Primärstruktur, verglichen zu Maus und Mensch, zugrundeliegt. Nicht betroffen von Spezies-Unterschieden ist, bei allen bisher unter-

suchten NGFs, das biologisch aktive Zentrum. Das große Spektrum der biologischen Effekte auf Zielzellen, das vom Mäuse NGF bestens untersucht worden ist, läßt sich im vollen Umfang qualitativ wie quantitativ auf Rinder NGF übertragen (Harper et al. 1983); es gibt keine Hinweise anzunehmen, daß für den Meerschweinchenfaktor etwas anderes gelten sollte, zumal er immunologisch dem Mäuse NGF näher steht (Chapman et al. 1981) als Rinder NGF. Auch der, aus der Sicht der Evolution, fernerstehende Kobra NGF zeigt zu den Rezeptoren der Hinterwurzelganglien vom Hühnchen eine mit Maus NGF vergleichbare Bindungsaffinität (Server et al. 1976). Selbst die NGFs entfernt verwandter Vertebraten Spezies enthalten also offensichtlich mindestens eine konservierte Region, die mit den NGF Zellmembranrezeptoren in Wechselwirkung treten und die biologischen Effekte herbeiführen, während dem restlichen Teil des Moleküls im Laufe der Evolution nicht dieser Zwang zur Konservierung auferlegt worden ist.

Über die Struktur-Funktionsbeziehung vom NGF ist sehr wenig bekannt. Durch partielle Proteolyse und durch Spaltung mit Cyanbromid (Server et al. 1977; Bradshaw 1978) konnte das aktive Zentrum auf eine Region zwischen Rest 10 und 117 der Aminosäuresequenz (Angeletti et al. 1972) eingegrenzt werden. Modifikationsstudien an den drei Tryptophanen des Proteins legen es nahe, daß diese Reste strukturell an der Interaktion mit dem Rezeptor beteiligt sind (Frazier et al. 1973.; Cohen et al. 1980). Jedoch können bei diesen Untersuchungen Artefakte als Folge der Oxidation des Indolrings nicht gänzlich ausgeschlossen werden (Cohen et al. 1980). Bisher ist völlig offen, ob das biologisch aktive Zentrum sich in einer einzigen Region konsekutiver Reste im Protein manifestiert. Der Vergleich der Primärstrukturen bei Maus und Mensch hat wegen der großen Homologie diese Vorstellung nicht bestätigen können. Durch die Hinzunahme einer dritten Spezies mag dies vielleicht möglich werden, zumal für den Rinderfaktor eine etwas größere relative Molekularmasse in Betracht gezogen wird, und die Zahl der Disulfidbrücken mit zwei, anstelle der charakteristischen drei (h, m, gp, Kobra)

pro Untereinheit angegeben wurde (Harper et al. 1982). Wenn die DNA-Sequenzierung diesen Unterschied tatsächlich bestätigen kann, so würde dies die Aufklärung der Struktur-Funktionsbeziehung erheblich erleichtern.

5.1. Identifizierung NGF spezifischer Sequenzen im Genom des Rindes

Die Klonierung von Rinder NGF soll über einen cDNA Ansatz erfolgen, wobei als Gewebe mRNA aus einer Geschlechtsanhangsdrüse (siehe 5.2.) verwendet werden soll. Die erstellte cDNA-Bank soll mit NGF spezifischen Oligodeoxynukleotiden und mit Restriktionsfragmenten vom Plasmid pMN (siehe Anhang A-1) als Hybridisierungsproben durchsucht werden. Voraussetzung für diese Vorgehensweise sind Bedingungen geeigneter Stringenz für die Koloniehybridisierung, die den Speziesunterschied zwischen Maus und Rind berücksichtigen. Deshalb wurde zunächst versucht, die NGF spezifische Sequenz in der Rinder DNA über den Southern Blot nachzuweisen und gleichzeitig die ungefähre Kopienzahl des Gens abzuschätzen. Die Rinder DNA wurde aus Sperma präpariert, wobei die Spermien mit Guanidiniumthiocyanat lysiert werden mußten; die schonende Zellyse mit Proteinase K und Sarcosyl (Blin und Stanford 1976) funktioniert wegen der Anwesenheit von Proteaseninhibitoren im Samenplasma und einer keratinähnlichen Außenmembran des Spermiumkopfes (Borenfreund et al. 1961) nur sehr unzureichend (siehe Methoden 19.). Eine Größenabschätzung der präparierten DNA aus Mausspeicheldrüse, Kalbsthymus und Rinderspermium zeigte, daß ein großer Anteil des Materials größer als 48kb war. Nach der Überprüfung der Restrictierbarkeit der einzelnen Präparationen wurde zwischen 5 und 10µg genomische DNA mit den Restriktionsenzymen Hind III und Eco RI vollständig über Nacht geschnitten und nach der elektrophoretischen Auftrennung in 0,8% Agarose auf Ni-

trozellulose geblottet (Southern 1975). Als Hybridisierungsprobe diente ^{32}P nicktranslatiertes Plasmid pMN (siehe A-1) mit einer ungefähren spezifischen Aktivität von $4 \cdot 10^8 \text{ cpm}/\mu\text{g}$; die Hybridisierungsreaktion erfolgte in $3 \times \text{SSC}$ bei 50°C über Nacht. Der Filter wurde in $0,1 \times \text{SSC}$ ausgiebig gewaschen und dann autoradiographiert (Abb. 5-1). Im Maus Eco RI-Verdau (Spur 1) läßt sich nur ein Hybridisierungssignal ausfindig machen, was für den singulären Gencharakter von NGF in dieser Spezies spricht und den Befund von J.Scott (persönliche Mitteilung) bestätigt. Beim Rind findet man hingegen in der Hind III Restriktion (Spur 3) zwei NGF spezifische Fragmente mit einer abgeschätzten Länge von 4600 und 3400bp. Die gleiche Spezies mit Eco RI verdaut zeigt 5 Hybridisierungssignale, von denen eines (Abb. 5-1) mit zunehmender Stringenz beim Waschen ($0,1 \times \text{SSC}$, 60°C) verschwindet; das Signal bei ca. 1500bp stellt höchstwahrscheinlich ein Artefakt dar, weil es mit einer repetitiven genomischen Bande zusammenfällt. Ob die beiden Signale des Hind III Verdau durch eine Restriktionsstelle innerhalb des Gens entstanden sind, oder ob eventuell sogar zwei getrennte Gene existieren, kann mit diesem Ergebnis nicht entschieden werden. Zur Klärung dieser Frage verwendet man entweder andere Restriktionsenzyme mit einer sechser Erkennungssequenz und prüft, ob diese Doppelbande permanent bestehen bleibt, oder aber man wählt eine kürzere, radioaktive Hybridisierungsprobe, die beispielsweise nur einen Teil von der maturen β -Untereinheit kodiert und wiederholt den Southern Blot. Verschwindet jetzt eines der beiden Signale, so spricht dies für eine einzelne Kopie des Gens im Genom.- Dieses zusätzliche Experiment ist, wie eben erläutert, mit einem 5'endmarkierten 18mer Oligonukleotid (NGF 1; siehe Anhang A-2) durchgeführt worden, welches statistisch gesehen eine NGF spezifische Sonde darstellt. Seine Sequenz kommt nämlich im Säugetierge-nom (ca. $3 \cdot 10^9 \text{ bp}$) nur mit einer Häufigkeit $\ll 1$ vor ($f = 1/4^n$ 2a; a:= Genomgröße in bp, n:=Länge des Oligonukleotids). Als Anhaltspunkt für die Wahl einer geeigneten Hybridisierungstemperatur kann die empirische Regel zur scheinbaren Schmelz-

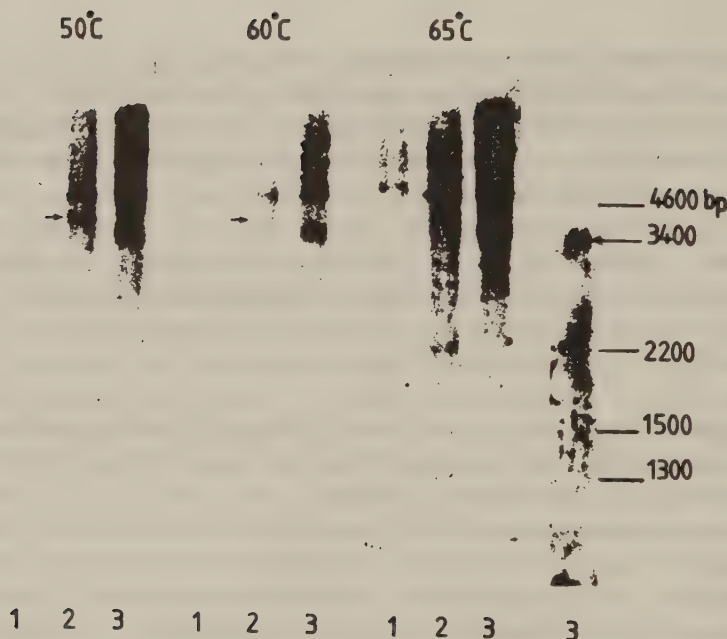


Abb. 5-1: Nachweis des NGF Gens im Genom des Rindes durch Southern Analyse

Ungefähr 10µg restringierte genomische DNA wurde in 0,8% Agarose aufgetrennt. Die auf Nitrozellulose transferierte DNA wurde mit "nicktranslatiertem" pMN als NGF spezifische Probe ($4 \cdot 10^8$ cpm/µg) bei 50°C hybridisiert. Das Filter wurde nacheinander in 50, 60, 65°C gewaschen und autoradiographiert. Eco RI Verdau von Maus (1) und Rind (2); Hind III Verdau vom Rind (3). In der einzelnen Spur 3 ganz rechts wurde die restringierte DNA mit einem spezifischen 18mer Oligonukleotid (oligo NGF 1) hybridisiert.

punktbestimmung in Gegenwart von 6xSSC nach Suggs et al. (1981): $T_m = 2^{\circ}\text{C} \cdot X_{(\text{A:T})} + 4^{\circ}\text{C} \cdot Y_{(\text{G:C})}$ ($X_{(\text{A:T})}$:= Zahl der AT Basenpaare; $Y_{(\text{G:C})}$:= Zahl der GC Basenpaare) herangezogen werden. Nach Berücksichtigung von 50% Formamid dürfte der nach Suggs kalkulierte T_m -Wert für das Oligonukleotid von 58°C auf ca. 20°C absinken. Diese Überlegungen führten zur Hybri-

disierung der geblotteten genomischen DNA in 5xSSC, 50%Formamid bei 10°C mit ca. $2,8 \cdot 10^6$ cpm/ml und einer spezifischen Radioaktivität von ca. $2 \cdot 10^6$ cpm/pmol. Das Waschen des Filters erfolgte in 2xSSC jeweils ca. 15min lang mit steigender Temperatur (RT, 35°C, 50°C). Wie aus Abb. 5-1 (Spur 3, ganz rechts) zu entnehmen ist, verschwindet mit dieser radioaktiven Probe das obere Signal (bei 4600bp) des Hind III Verdau, und damit spricht dieses Resultat für den singulären Charakter des NGF Gens im Rind.

5.2. Qualitativer Nachweis von NGF-Transkripten in der Glandula vesiculosa

Der Nervenwachstumsfaktor ist im Wirbeltierorganismus in den meisten sympathisch innervierten Organen in äußerst geringen Konzentrationen vorhanden (Atrium 3,6ng/g Naßgewicht, Ventrikel 1ng/g Naßgewicht, siehe Heumann et al. 1984), die sich bis in jüngste Vergangenheit jeder quantitativen Erfassung entzogen. Daneben gibt es, bisher physiologisch unverstanden, exokrine Drüsen, die NGF in größeren Mengen sezernieren und sich als Ausgangsmaterial für eine Proteinreinigung anboten. Kurioserweise unterliegt jedoch deren NGF Produktion innerhalb der Vertebraten keinen konservativen Zwängen oder Verwandtschaftsbeziehungen. So konnte in den Giftdrüsen einiger Schlangenfamilien NGF nachgewiesen werden, aber außer in der männlichen Maus und der afrikan. Ratte sonst nirgends mehr in der zur Giftdrüse homologen Speicheldrüse der Mammalia. Die akzessorischen Geschlechtsdrüsen des Stieres (Prostata, Samenleiterampulle, Glandula vesiculosa) stellen einen weiteren, auf wenige Säuger beschränkten Syntheseort mit einem relativ hohen endogenen NGF-Gehalt dar. Diese Drüsen bieten sich deshalb als mRNA-Quellen für eine cDNA-Klonierung an, weil der erhöhte NGF-Gehalt auf einen entsprechenden Anstieg spezifischer mRNA

zurückzuführen sein dürfte. Eine solche Regulation über die Transkription wird zumindest aus den unterschiedlichen mRNA^{NGF} Niveaus männlicher und weiblicher Speicheldrüsen nahegelegt (persönliche Mitteilung R. Heumann). Um zu prüfen, ob die akzessorischen Drüsen des Stieres tatsächlich eine nennenswerte Menge an NGF mRNA enthalten, wurde die zelluläre RNA der größten Anhangsdrüse beim Wiederkäuer, der Glandula vesiculosa, nach einem modifizierten Chirgwin Protokoll präpariert, und die poly(A)⁺ RNA wurde mittels einmaliger Passage über oligo(dT)-Zellulose (Aviv und Leder 1972) angereichert. Nach Überprüfung der Integrität der Präparation wurden 100ng-7µg hitzedenaturierte mRNA an Nitrozellulose gebunden und im sogenannten Dot-Blot Verfahren (Thomas 1980) auf NGF spezifische Transkripte hin untersucht (siehe Methoden Pkt.26). Als Hybridisierungsprobe wurde ³²P nicktranslatiertes cDNA^{NGF}-Insert als auch komplettes chimäres Plasmid (pMN) verwendet. Mit beiden radioaktiven Proben (1-2·10⁶ cpm /ml) läßt sich bereits in 100ng mRNA deutlich ein Signal feststellen (Abb. 5-2 A). Eine sorgfältige Quantifizierung des Transkripts mit einer nicktranslatierten Probe von durchschnittlich 100bp Länge führte zu einem 15x niedrigeren spezifischen mRNA Gehalt beim Rind, verglichen mit Mausspeicheldrüse (R. Heumann unpubliziert). Damit dürfte die relative Häufigkeit der spezifischen mRNA 0,007% in der Glandula vesiculosa betragen, sofern die Abschätzung in der Speicheldrüse korrekt war (Scott et al. 1983). Dieser geringe Gehalt ist für eine erfolgreiche cDNA-Klonierung erschwerend, und es wäre deshalb der Sache sehr dienlich, könnte man die spezifische mRNA durch Präparation von membrangebundenen Polyribosomen anreichern. Aus diesem Grund wurde das homogenisierte Drüsengewebe von seinen Zellkernen und -trümmern durch eine niedertourige Zentrifugation befreit und auf einen Saccharose-Stufengradienten, in Gegenwart von 10mM Vanadylribonukleosidkomplexe (Berger et al. 1979) als RNasen-Inhibitor, gegeben. Nach einem Ultrazentrifugationsschritt sammeln sich die membranassoziierten Polysomen als Bande in der Interphase zwischen

der 1 und 2M Saccharose an. Sie können dort als Mikrosomenfraktion geerntet werden. Die Membranen wurden mit nichtionischem Detergenz solubilisiert, und die zelluläre RNA wurde nach der Phenolextraktion in Gegenwart von Hydroxychinolin Äthanol präzipitiert. Die so erhaltene RNA wurde in einem Harnstoff-Agarosegel aufgetrennt und als degradiert befunden (A-5). Offensichtlich ist dieses Drüsengewebe, ähnlich wie der Pankreas, reich an endogenen RNasen (Chirgwin et al. 1979) und/oder der Vanadylribonukleosidkomplex kann die in diesem Gewebe exprimierten RNasen nur unzureichend inhibieren. Was auch immer die genaue Ursache gewesen sein mag, die Chance einer unschweren Anreicherung der mRNA, die im gün-



Abb.5-2: Nachweis von NGF-Transkripten in der Glandula vesiculosa des Rindes

A) 0,1, 1, 2, 7µg mRNA aus Glandula vesiculosa wurden mittels des Dot-Blot Verfahrens auf NGF spezifische Transkripte geprüft. Als Hybridisierungsprobe diente das "nicktranslatierte" Pst I Fragment von pMN. Als negative Kontrolle fungierte 50, 100 und 200ng Globin mRNA.

B) Im Northern Blot wurde die Länge des spezifischen Transkripts vom Rind (Spur 2) mit dem von Maus (Spur 1) verglichen. Im Rind ist die mRNA^{NGF} ca.200b länger.

stigsten Fall einen Faktor 10 ausmachen kann, war damit vergeben.

Größenvergleich des NGF Transkripts bei Rind und Maus

Zur Beurteilung der Vollständigkeit späterer cDNA-Klone ist die Größe des NGF-Transkripts in der Glandula vesiculosa bestimmt worden. Die mRNAs aus den Geweben von Rind und Maus sind, wie beschrieben, vor der Elektrophorese glyoxyliert (Thomas 1980) und durch Konvektion über Nacht auf Nitrozellulose transferiert worden. Als Hybridisierungsprobe diente eine einzelsträngige mit (α - ^{32}P)UTP markierte NGF spezifische RNA (Melton et al. 1984). Letztere wird durch eine RNA-Polymerase Reaktion in vitro synthetisiert; hierzu mußte das cDNA^{NGF} Insert der Maus in das Plasmid SP 64 umkloniert werden, das vor seiner Polylinker Region den starken Promoter des Bakteriophagen SP6 trägt. Wegen der größeren Stabilität der RNA-Duplexe mußte bei sonst gleichem Hybridisierungspuffer (siehe Methoden: Hybridisierung mit NGF 1 unter Pkt.24) die Temperatur auf 65°C erhöht werden, um unspezifische Bindung der radioaktiven Probe an die 28S ribosomale Untereinheit zu vermeiden (Heumann et al. 1984). Nach dem Waschen des RNA-Blots in 0,1xSSC bei 60°C wurde das Filter bei -70°C mit einer Verstärkerfolie autoradiographiert (Abb. 5-2 B). Es stellte sich heraus, daß das Rinder NGF-Transkript um ca. 200b länger als in der Maus ist und somit eine Länge von rund 1500b erreicht. Interessant wäre es nun zu wissen, ob sich dieser Längenunterschied der RNA auch im Vorläuferprotein wiederfindet. Bemühungen die mRNA^{bNGF} über Saccharose-Gradientenzentrifugation anzureichern und durch "hybrid-selected translation" das zugehörige Genprodukt zu identifizieren, verliefen trotz Optimierung der zellfreien Translation und der gleichzeitigen Verwendung von ^{35}S -Cystein und ^{35}S -Methionin ergebnislos.

5.3. Erstellung einer cDNA-Bank der Glandula vesiculosa

Gemäß der Dot-Blot Resultate besitzt die Glandula vesiculosa einen erhöhten endogenen mRNA^{NGF}-Gehalt, aber trotzallem kann nur mit einer relativen Häufigkeit kleiner als 0,01% gerechnet werden. Somit ist eine erfolgreiche Klonierung, verglichen zur Ausgangssituation bei der Speicheldrüse, deutlich erschwert. Bei der Maus konnten bereits aus 5000 Transformanten sechs positive Klone isoliert werden, und jetzt sollten es wenigstens 50.000 unabhängige cDNA-Klone sein, um wenigstens zwei oder drei positive Rekombinanten finden zu können. Angesichts dieser Voraussetzung und der Mißerfolge, membrangebundene Polysomen zu präparieren oder durch Saccharose-Gradientenzentrifugation eine Anreicherung der spezifischen RNA vorzunehmen, schied bei der Planung des Projekts von vornherein eine bestechend einfache Klonierungsstrategie - die mRNA:cDNA Methode - aus. Bei dieser Technik wird lediglich ein mRNA:cDNA Hybridmolekül erstellt, welches durch Addition komplementärer, homopolymerer Basen an Plasmid und Insert in den Vektor durch Basenpaarung eingeführt wird (Wood und Lee 1976; Zain et al. 1979). Leider ist dieses Vorgehen bei der Transformation wenigstens 10-mal ineffizienter als die Doppelstrang cDNA-Klonierung. Heute lebt die Idee in der sogenannten Gubler Methode fort, modifiziert durch die Einführung eines RNase H Schritts (Gubler et al. 1984). Man erzielt nun sehr gute Resultate in Bezug auf Transformation und Insertlänge.

Die noch vor ein paar Jahren gängigste Doppelstrang cDNA-Methode arbeitet mit dem einzelstrangspezifischen Enzym S1 von Aspergillus oryzae (Abb. 5-3). Nach beendeter Erststrangsynthese dient eine S1 sensitive Haarnadelschleife als Primer für die Synthese des zweiten Stranges und verbindet deshalb 1. und 2. DNA-Strang kovalent miteinander. (Efstratiadis et al. 1976). Der S1 Verdau, der bei Hochsalz durchgeführt werden muß, um die Einzelstrangspezifität des Enzyms zu sichern (Shenk et al. 1975), läuft oft nicht mit der ge-

wünschten Spezifität ab und führt bisweilen zu erheblichen Verlusten am 5'Ende der mRNA.- Viel ist über die Optimierung der reversen Transkriptasereaktion geschrieben worden, die zu einer Steigerung der Ausbeute an vollständigen Transkripten geführt hat. Inzwischen geht man jedoch davon aus, daß viele dieser vorgeschlagenen Reaktionsbedingungen indirekt wirkten, indem sie die oft mit der reversen Transkriptase assoziierte Ribonuklease gehemmt haben (Buell et al. 1978).

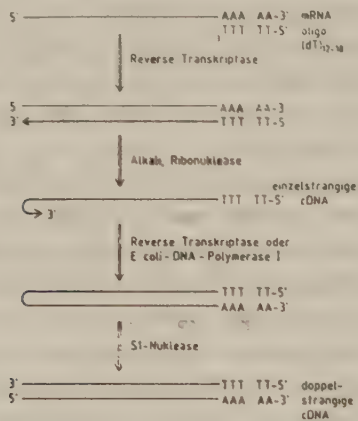


Abb. 5-3: Reaktionsschritte bei der Herstellung doppelsträngiger DNA

Die Verbesserung der käuflichen Enzympräparate und die Verwendung von RNasin haben die Transkripte erheblich verlängert (Retzel et al. 1980). Somit bleibt bei dieser Klonierungsprozedur der S1 Verdau als letzter kritischer, schwer in den Griff zu bekommender Schritt bestehen, und selbst bei den vollständigsten cDNA-Klonen fehlen mindestens 15-20 Nukleotide. Land und Mitarbeiter umgingen dieses Problem und verlängerten das 3'Ende des cDNA Stranges mit 20-25 dCMP Resten. Die Synthese des zweiten Stranges kann dann durch oligo (dG) induziert werden (Rougeon et al. 1975; Land et al. 1981). In den letzten 2-3 Jahren hat die Technik der

Vektor induzierten cDNA Synthese die populäre S1 Prozedur nahezu vollständig verdrängt. Zwei im Detail unterschiedliche Verfahren sind von Okayama/Berg (1982) und von Heidecker/Messing (1983) beschrieben worden, die beide die DNA-Synthese direkt am linearisierten Plasmid bewerkstelligen und durch komplementäres, homopolymeres "Tailing" den Ringschluß des Vektors herbeiführen. Beide Methoden führen zu chimären DNA-Molekülen mit durchschnittlich längeren cDNA-Sequenzen, die bei der Okayama-Berg Prozedur ohne weiteres mehrere 1000bp Länge erreichen können (Maniatis et al. 1982 b) und gute Klonierungseffizienzen bezogen auf die eingesetzte mRNA Menge besitzen. Die Okayama-Berg Prozedur scheint die überlegenere der beiden zu sein, da mehrfach von knapp 10^5 Transformanten pro Mikrogramm eingesetzter mRNA zu hören und zu lesen ist. - Dies ist ein ganz wesentliches Kriterium für die Neurobiologie, die mit geringen mRNA-Mengen und sehr seltenen RNA Spezies konfrontiert ist. In den folgenden Abschnitten wird in erster Linie über die cDNA-Klonierung von Rinder NGF mit dem klassischen S1 Verdau berichtet werden. Parallel zu diesem Ansatz wurde in Zusammenarbeit mit A. Shaw eine cDNA-Bank nach Heidecker-Messing (A-6) etabliert.

5.3.1. Synthese doppelsträngiger cDNA, S1 Nuklease und terminale Transferase Behandlung

Synthese doppelsträngiger cDNA: Vor der eigentlichen Erststrangsynthese wurde die mRNA auf eventuelle Degradation untersucht und zusätzlich ihre biologische Aktivität durch in vitro Translation geprüft.

Die Synthese erfolgt im wesentlichen nach einem Protokoll von Mc Donald et al., modifiziert von De Gennaro (unpubliziert). $15\mu\text{g}$ poly(A)⁺ RNA wurden mit Methylquecksilberhydroxid (Payvar et al. 1979) 10min lang bei Raumtemperatur

tionenprodukten.

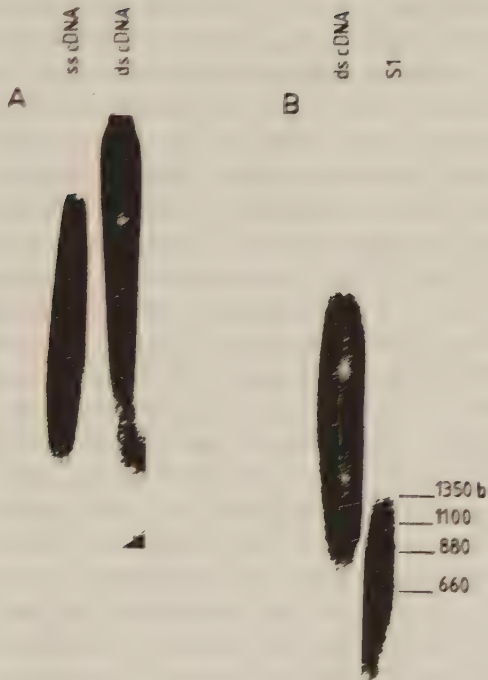


Abb. 5-4: Überprüfung der synthetisierten cDNA im alkalischen Agarosegel

A) Ein erfolgreiches "Selbstprimen" des zweiten Stranges der cDNA muß wegen der alkalischen Denaturierung eine Verschiebung des radioaktiven Materials in Richtung Auftragsstelle bewirken.

B) Präparativer S1 Verdau ds cDNA

Zweitstrangsynthese: Die kritischen Parameter dieser Reaktion sind Temperatur, die Konzentration und die Natur des monovalenten Kations, die Inkubationszeit und die Enzymkonzentration. Der pH-Wert von 6,9 ist bei Verwendung von

DNA-Polymerase I strikt einzuhalten, weil er die unerwünschte 5'-3'-Exonukleasenaktivität weitgehend unterdrückt. Heute verwendet man deshalb lieber das Klenow-Fragment der E. coli DNA-Polymerase und schützt sich damit wesentlich effektiver vor dieser Exonukleasenaktivität. Die Inkubationszeit sollte wenigstens 4h betragen, 20h sind jedoch vorzuziehen. Dies ist insbesondere angesichts der Instabilität der Haarnadelschleife am 3' Ende der ss cDNA (Abb. 5-3). Eine lange Inkubationszeit erhöht einfach die Chance, daß eine solche Struktur als intramolekularer Primer wirken kann und durch die Polymerase verlängert wird. Nicht nur komplette, sondern angeblich auch unvollständige reverse Transkripte können Substrat dieser Reaktion sein und werden in doppelsträngige Moleküle überführt. Heute sind die erstmals veröffentlichten und zwei Jahre später als optimal bestätigten Bedingungen für diese Synthese immer noch, so gut wie unverändert, in Gebrauch (Nisticciadis et al. 1976; Wickens et al. 1978). - Aus nicht einsichtigen Gründen erfolgte diese Zweitstrangsynthese nicht zuverlässig. Von vier Versuchen führten nur zwei zum erwünschten Erfolg und verschoben den radioaktiven cDNA-Schwerer in Richtung der Auftragsstelle des alkalischen Agarosegels, was der Natur, einseitig kovalent verknüpfter Stränge doppelsträngiger DNA, unter diesen Laufbedingungen entspricht (siehe Abb. 5-4 A). Anstelle von DNA-Polymerase für den zweiten Strang kann genausogut auch reverse Transkriptase mit einer bisher bekannten Ausnahme, verwendet werden. Nisticciadis hat deshalb vorgeschlagen, beide Enzyme hintereinander für den gleichen Syntheseschritt zu verwenden, mit der Absicht so die Ausbeute kompletter ds cDNA Moleküle zu verbessern. Partielle doppelsträngige Moleküle sind vermutlich eine Folge von Sequenzen, die ein weiteres Fortlauffahren des Enzyms auf seiner Matrize verhindern und so die Synthese stoppen. Weil diese Stoppsequenzen für beide Enzyme nach heutigem Dafürhalten unterschiedlich sind, können sich beide in ihrer Wirkung ergänzen.

Verdau mit der S1 Nuklease: Der nukleolytische Abbau der Haarnadelstruktur ist der problematischste enzymatische Schritt der gesamten Klonierung, zumal von ihm alles abhängt und bei Einhaltung dieses Protokolls bereits viel Zeit für die Säulenchromatographien, Phenolextraktionen, Äthanol-fällungen und Gelelektrophoresen investiert worden ist. Sehr attraktiv ist deshalb eine Modifikation der eben beschriebenen cDNA-Synthese, welche die Zahl der notwendigen Manipulationen erheblich reduziert und die Synthese des ersten und zweiten DNA-Stranges in einem einzigen Ansatz ohne Pufferaustausch möglich macht (Wickens et al. 1978).

Um den vollständigen Verlust des wertvollen Materials auszuschließen, sollte der S1-Verdau mit einem Vorexperiment beginnen, bei dem die Einzelstrangspezifität des Enzympräparates und gleichzeitig die Struktur der ds cDNA überprüft werden kann. Zu diesem Zweck erhitzt man, nach einem Vorschlag von Goodman et al. (1979), ein Aliquot der ds cDNA kurzzeitig im S1 Puffer auf 96°C und kühlt die Probe schnell im Eisbad ab. Nun halbiert man sie, fügt in einem Fall S1 Enzym zu und inkubiert beide gemeinsam 60min bei 37°C. Durch TCA-Präzipitation mißt man die säurefällbare Radioaktivität. 50-60% der eingesetzten cpms sollten nach dieser ersten Behandlung mit S1 resistent sein. Erhitzt man dieselbe Probe nochmals, kühlt sie wiederum rasch ab und setzt ein zweites Mal S1 Enzym zu, so sollte jetzt nur noch ca. 10% der ursprünglich eingesetzten Radioaktivität fällbar sein. Dieses Resultat kann jedoch nur erzielt werden, wenn die erwünschte "Hairpin"-Struktur tatsächlich vorhanden und das eingesetzte Enzym in Ordnung ist. Dieser Test ist sowohl mit cDNA Material nur nach der Klenow Behandlung durchgeführt worden als auch nach Reaktion mit Klenow Fragment und reverser Transkriptase. In beiden Fällen war die Resistenz gegenüber S1 bei einmaliger Inkubation gegeben, aber es schien kein eklatanter Unterschied bzw. eine Verbesserung der Zweitstrangsynthese durch die Inkubation mit beiden Polymerasen zu bestehen.- Der präparative S1-Verdau wurde mit ca. 1µg ds cDNA, exakt nach Vorschrift (Goodman et al. 1979) in

Gegenwart eines Überschusses an Enzym bei Raumtemperatur, aber zeitlich strikt begrenzt, durchgeführt. Das Endprodukt dieser Behandlung sollte duplexe ds cDNA sein, die beidseitige Sasenaddition mit terminaler Transferase erlaubt. Die analytische Abschätzung zeigte Stränge zwischen 300-1000bp auf (Abb.5-4 B). Es ist nun ratsam, dieses Material vor seiner Klonierung erst noch einer präparativen Größenfraktionierung zu unterziehen - beliebte Möglichkeiten sind Gradientenzentrifugation oder Säulenchromatographie über Sepha-

Frakt.Nr
5 6 7 8 9 10 11 12



Abb. 5-5: Präparative Größenfraktionierung S1 behandelter ds cDNA

Nach dem S1 Verdau ist die ds cDNA über eine Sepharose CL 4B Säule aufgetrennt worden, und Aliquots der erhaltenen radioaktiven Fraktionen wurden im alkalischen Agarosegel analysiert. Das Material der Fraktionen 4,5,6 und 7 wurde zusammengefaßt und für die "Tailing"-Reaktion verwendet.

rose CL 4B. Größere Polynukleotide werden nämlich ineffizienter als kleinere kloniert, und somit würde ihr Anteil in unerwünschter Weise in der cDNA-Bank absinken (Humphries et al. 1977). In Abb. 5-5 ist die Größenverteilung der Fraktionen einer solchen Auftrennung mit einer 1ml Sepharosesäule zu sehen (siehe auch Methoden Pkt. 28.); die Fraktionen 4, 5, 6 und 7 sind für die Klonierung zusammengefaßt und mit Äthanol präzipitiert worden. Dieser Pool enthält gut 50% der auf die Säule aufgetragenen Radioaktivität und schließt duplexe DNA-Moleküle bis 1000bp ein.

Homopolymere "Tailing" Reaktion der ds cDNA mit dC und Integration in die Vektor-DNA: Eine gängige Methode, ds cDNA in ein Plasmid zu integrieren, wird durch die Addition komplementärer Basen an Vektor und Insert möglich. Mit der terminalen Transferase werden dG- und dC-Schwänze oder dA- und dT- Schwänze an die DNA-Partner addiert, und beide können über Wasserstoffbrückenbindung, gemäß der Watson und Crick Basenpaarung, miteinander unter Ringschluß kombinieren. Dabei müssen wegen der thermodynamischen Stabilität dA:dT Schwänze länger sein als dG:dC Schwänze. Als optimal für die Effizienz der DNA Transformation gelten fast 100 Reste für die dA:dT Paarung und zwischen 15-20 Resten für eine dG:dC Paarung (Peacock 1981). In den letzten Jahren wird "G/C Tailing" bevorzugt und zwar nicht zuletzt auch wegen der potentiellen Exzision des Inserts aus der singulären Pst I Stelle von pBR322 oder vergleichbarer Vektoren. Werden nämlich an die überstehenden 3'Enden des Plasmids dGs addiert, so wird die ehemalige Restriktionsstelle im späteren chimären DNA-Molekül rekonstituiert, vorausgesetzt die verwendeten Enzyme sind nicht durch Exonuklease verunreinigt (Dugaiczky et al. 1980). In der Praxis hat sich gezeigt, daß bei entsprechender Sorgfalt aus 80-90% der rekombinierten Plasmide das klonierte Fragment herausgeschnitten werden kann (Maniatis et al. 1982). Diese Klonierungsstrategie über homopolymere, komplementäre Reste bringt jedoch durch eine besondere Eigenschaft der terminalen Transferase ein Problem mit sich. Das Enzym bindet nämlich nur einzelsträngige

Einlesezonen für guter Aktivität, wobei zwei Desoxythymosila-
terase das Minimum darstellen (Kato et al. 1967). Eine der 2
Restriktionsstelle ist somit ein gutes Substrat, und über
das der angewachsenen Enden werden unter optimierten Bedin-
gungen über das 3 Ende hinausverlängert. Wesentlich schlech-
ter schaut die Situation bei schwachbindender oder gar zurück-
verreißten 3 Enden von doppelsträngiger DNA aus. Wesentliche
beträgt die Effizienz sogar in Gegenwart von Co^{++} -Ionen
(Muller et al. 1977), anstelle der früher verwendeten
 Mg^{++} -Ionen, nur 4%. Wird daher die cDNA als Substrat verwen-
det, so darf höchstens dieser Anteil für weitere Überlegun-
gen berücksichtigt werden: die cDNA-Moleküle haben nun aber
zwei 3 Enden, die unabhängig voneinander als Substrat an der
Reaktion teilnehmen. Nur von solchen Molekülen, die beidsei-
tig mit 3' gekennzeichnet worden sind, kann eine Insertion in
den Vektor erwartet werden: ihr Anteil beträgt aber in der
Molekelpopulation nur 10% oder weniger. Mit anderen Worten,
höchstens 10% der angewachsenen Substratmenge, kann nach
Abschluß der terminalen Transferase Reaktion mit Vektor-DNA
rekombinieren. Diese Abschätzung ist für die Paarung von
Vektor und Insert insofern von Bedeutung, weil äquimolare
Mengen übersteigender 3 Enden effiziente Rekombination ge-
währleisten und das Verhältnis von Nichtrekombinanten zu Re-
kombinanten klein belassen sollte. Für die Praxis schlugen
Michelson et al. (1981) einen 2-fachen molaren Überschub an
cDNA gegenüber Vektor-DNA vor. In einem Vorexperiment sind
ihre Reaktionsbedingungen, an dem mit Pst I linearisierten
Plasmid pUC9 bei zwei verschiedenen Temperaturen, auspro-
biert worden (1-7). Als Substrat wurde ^{32}P markiertes Desoxy-
cytidin-3 triphosphat verwendet, in Hinblick auf die Mög-
lichkeit einer Doppelmarkierung, zur Abschätzung der 3'
Schwanzlänge bei der ^{32}P -markierten ds cDNA. Die Zahl der
3 Enden beim cDNA-Material kann nur sehr grob abgeschätzt
werden und soll durch Unterscheidung der mittleren Basenlänge
der cDNA eher überschätzt werden, um sicherzustellen, daß
die terminale Transferase Reaktion bei weniger als 1000
3 Enden abläuft (Michelson et al. 1981). Über den radioakti-

ven Tritiumeinbau konnte, bei Einhaltung der von den Autoren erfolgreich erprobten Bedingungen für cDNA (siehe Methoden 29.), der mittlere addierte dC-Schwanz auf 14 Reste geschätzt werden.

Für die Konstruktion der rekombinierten Plasmid-DNA wurden 0,25pmol (=0,7µg) dG "getailter" pBR322 (erhältlich bei NEN) mit abgeschätzten 0,4pmol ds cDNA (dies entspricht 1/5 der Gesamtmenge), bei einer Endkonzentration von 1ng Vektor pro µl, gemischt und zur Freilegung der 3'Enden kurz auf 65°C erhitzt. Die eigentliche Paarung komplementärer Stränge vollzog sich zunächst für 2h bei 43°C und wurde dann bei langsamer Abkühlung auf Raumtemperatur über ungefähr denselben Zeitraum fortgesetzt (Land et al. 1983).

5.3.2. Optimierung der Transformationseffizienz von E.coli K12

Eine Probetransformation von E.coli K12 Hb 101 Zellen mit pBR322 nach der üblichen CaCl₂-Methode (Mandel et al. 1970), bei Berücksichtigung der Dagert und Ehrlich Empfehlung (1979) zur Steigerung der Transformationsrate, führte wiederholt nur zu $8 \cdot 10^4$ Transformanten pro Mikrogramm Vektor-DNA. Parallel durchgeführte Transformationen mit rekombinierten cDNA Plasmiden, deren Konstruktion im vorhergehenden Abschnitt erläutert wurde, führte ebenso zu unzufriedenstellenden Resultaten. Eine Hochrechnung machte deutlich, daß mit der gesamten synthetisierten ds cDNA eine Bank von höchstens 5000 Klonen erstellt werden könnte. Dies wäre rund eine Größenordnung zu niedrig, um mRNA-Moleküle mit der geschätzten relativen Häufigkeit kleiner als 0,01% erfolgreich zu klonieren.

Genau zu jenem Zeitpunkt berichtete D. Hanahan (1983) über eine Transformationsprozedur, die zwei Größenordnungen effizienter sein sollte als herkömmliche Methoden. Wesentli-

che Veränderungen sind das Anziehen der Zellen in Gegenwart einer erhöhten Magnesiumkonzentration und das Kompetentmachen der Bakterien in einer Lösung mit Mn^{++} -, Ca^{++} -und Rb^+ Ionen, Dimethylsulfoxid, Dithiothreitol und Hexammincobalt (III)-Ionen (siehe bei Methoden unter 31.). Dimethylsulfoxid (DMSO) und Dithiothreitol (DTT) stimulieren dabei unabhängig voneinander die Transformation im Vergleich zu Zellen ohne diese Zusätze. Diese positiven Effekte können jedoch nur bei hochwertigen Reagenzien beobachtet werden. Geringfügig mit Oxidationsprodukten verunreinigtes DTT kann bereits ausreichen, an Stelle einer Stimulation eine allgemeine Hemmung der Transformation zu bewirken (Daten nicht gezeigt). 2-Mercaptoäthanol kann an die Stelle von DTT treten und ist offensichtlich auch in der Anwendung weniger problematisch, weil ein positiver Effekt, wie Abb. 5-6 zeigt, auch mit einer älteren Charge erreicht werden kann. Niemals kann aber die gleiche Stimulation wie mit DTT erzielt werden (Hanahan 1983). Es lag nahe zu untersuchen, welchen Effekt wohl die Lagerung der Bakterienzellen im Hanahanpuffer (TFB) für 20h auf Eis hätte, hatte dasselbe Vorgehen doch bei der $CaCl_2$ -Methode eine 4-6fache Steigerung der Transformationsrate erbracht (Dagert und Ehrlich 1979). Das zu diesem Zweck durchgeführte Experiment ergab, daß die Zellen bei einer solchen Vorbehandlung mit TFB-Puffer und dem erst nachträglichen Zusatz von DMSO offenbar genauso gut transformieren wie Zellen, die exakt nach der Hanahan Methode sofort mit beiden Agenzien DMSO und DTT behandelt wurden (Abb. 5-6). Somit kann also durch die Lagerung der Zellen bei $0^{\circ}C$ auf den kritischen Zusatz von DTT verzichtet werden, ohne Einbußen in der Transformationseffizienz in Kauf nehmen zu müssen. Fast allen verwendeten Protokollen ist ein Hitzeschock der Zellen nach der Inkubation mit DNA gemeinsam. Die Protokolle weichen jedoch, bezüglich der verwendeten Temperatur und der Inkubationsdauer, voneinander ab. Welchen Effekt diese Behandlung auf die Transformationsrate beim Hanahan Protokoll ausübt ist untersucht worden, indem der jeweils

0,2ml fassende Bakterienansatz (entspricht 2,5ml Kultur) unterschiedlich lang im Wasserbad bei 42°C inkubiert wurde. Eine Verweildauer von 60sec erwies sich als optimal für dieses Volumen und bewirkte eine Steigerung der Effizienz um fast 100% (Abb. 5-6).

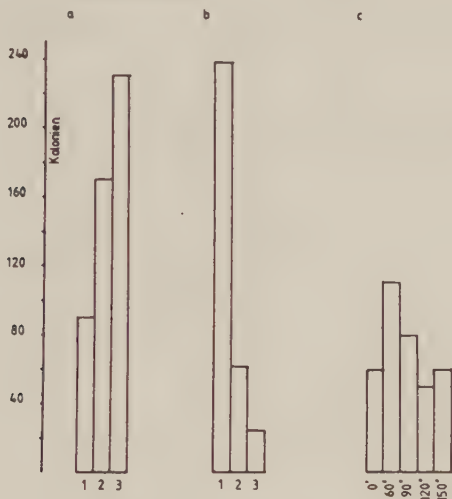


Abb. 5-6: Transformation von E.coli Hb 101 Zellen mit pBR322 nach Hanahan bei Variation einzelner Parameter

a) Die Zellen wurden mit abgeschätzten 100pg (10D=50µg/ml) Vektor in Gegenwart von DMSO (1), DMSO plus 2-Mercaptoäthanol (2) und DMSO plus DTT (3) transformiert.

b) Eine mit DMSO plus DTT gut vergleichbare, hohe Transformationsrate läßt sich erzielen, wenn man die Zellen 20h im Transformationspuffer (TFB) beläßt und anschließend nur DMSO zusetzt (1). Enthält der TFB bei dieser Inkubation DMSO (2) oder DMSO plus DTT (3), so läßt sich eine allgemeine Hemmung der Transformation beobachten.

c) Die Dauer des Hitzeschritts bei 42°C sollte für den üblichen Standardtransformationsansatz (0,2ml Bakteriensus. siehe Hanahan) 60sec nicht überschreiten.

Dieses modifizierte Protokoll nach Hanahan wurde nun mit zwei CaCl_2 -Methoden verglichen, zum einen mit dem original publizierten Dagert/Ehrlich Protokoll, zum anderen mit einer Abwandlung des letzteren (Mc Donald et al. unpubliziert), wobei dessen Transformationspuffer neben Ca^{++} - auch noch Mg^{++} - und K^+ -Ionen enthält (siehe Methoden Pkt.31). Um methodischen Irrtümern bei diesem Effizienzvergleich weitgehend vorzubeugen, wurde für alle drei Methoden dieselbe

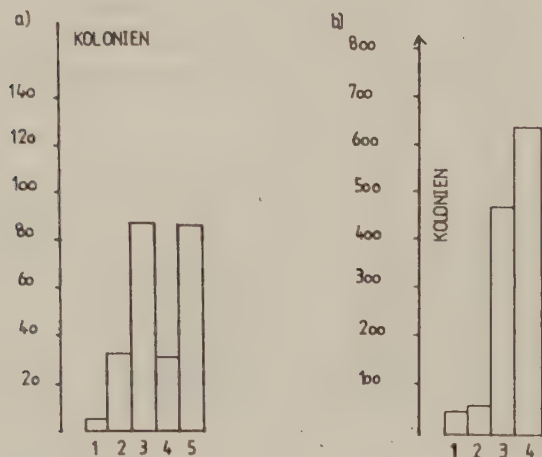


Abb. 5-7: Vergleich der Effizienz verschiedener Transformationsprotokolle

a) Hb 101 Zellen sind mit jeweils identischer Menge pBR322 ($5\mu\text{l} \pm 100\text{pg}$), aber nach unterschiedlichen Protokollen, transformiert worden. Modifiziertes CaCl_2 Protokoll (persönl. Mitteilung De Gennaro) (1); Dagert und Ehrlich Protokoll (2); Hanahan Protokoll mit DTT im Ansatz, beobachtbar ist in diesem Fall eine Hemmung durch DTT (3); modifiziertes Hanahan Protokoll (4).

b) C 600 Zellen wurden wie unter a) mit pBR322 transformiert. Im Gegensatz zu a) wurden die Zellen bei (1) 20h im entsprechenden Puffer auf Eis gehalten. Die sonstige Bezeichnungen sind wie bei a). Die genauen Ionenbedingungen etc. sind Material und Methoden zu entnehmen.

pBR322 Präparation und der gleiche DNA-Verdünnungsansatz verwendet; die Zahl der erzielten Transformanten bezieht sich mit voller Absicht auf ein bestimmtes Volumen (5µl) dieser Verdünnung und nicht auf Mikrogramm Plasmid, um zu unterstreichen, daß die ermittelten Daten nur als relative Meßwerte verstanden werden sollen (Abb. 5-7). Neben dem E.coli K12 Stamm Hb 101 wurde zusätzlich noch mit dem Stamm C 600 gearbeitet, weil letzterer als sehr guter Rezipient beschrieben worden ist (Hanahan 1983). Bei beiden Stämmen liefert die Hanahan Methode am meisten Transformanten. Bei den C 600 Zellen führt sie gegenüber Dagert u. Ehrlich zu einer Steigerung der Effizienz um den Faktor 10. Verglichen mit der Ausgangssituation, also der Transformation von Hb 101 Zellen nach Dagert/Ehrlich (Abb. 5-7), ist insgesamt eine Steigerung der Transformationsrate um den Faktor 20 erzielt worden. Mit diesen verbesserten Bedingungen sollte es nun rein rechnerisch möglich sein, eine Bank von 100.000 Rekombinanten zu erstellen, vorausgesetzt, die erzielte Steigerungsrate läßt sich von "supergecoilten" Plasmiden auf homopolymerverknüpfte Plasmidchimäre übertragen.- Unabhängig von der gewählten Transformationsmethode sollte sich ein $recA^+$ Stamm, wie beispielsweise C 600, mit offen-zirkulären Hybridmolekülen besser transformieren lassen als der isogenische Empfängerstamm mit dem rec^- Lokus (Peacock et al. 1981).

An dieser Stelle soll vorweggegriffen gesagt sein, daß mit den eben beschriebenen Bedingungen hochgerechnet eine Rinder cDNA-Bank von 150.000 und mehr Klonen hätte etabliert werden können. Allerdings bereitete die dieser Kalkulation zugrunde liegende tatsächlich ausplattierte Bank von 17.000 Klonen viel Mühe und war über eine große Anzahl von Platten verteilt, weil kein proportionaler Zusammenhang bestand zwischen gewachsenen Transformanten und der Zahl ausplattierter Transformationsansätze (à 0,2ml) pro Platte. Diese Wachstumshemmung ließe sich evtl. durch Spuren an DMSO erklären; ein gründliches Waschen der Zellen vor dem Ausplattieren bewirkte jedoch das Gegenteil. So ist bei der hier befolgten

Strategie die Zahl von 150.000 mehr mathematischer als praktisch realisierbarer Natur.

5.3.3. Erstellung der cDNA-Bank, Koloniehybridisierung mit einem 18mer Oligonukleotid und einem Restriktionsfragment

Von den ersten Rinder cDNA-Klonen, die auf Tetrazyklinplatten wuchsen, wurden zehn Kolonien willkürlich herausgegriffen und Minipräparationen der Plasmide durchgeführt. Ihr Laufverhalten wurde im Agarosegel mit pBR322 verglichen. Sieben der zehn untersuchten Plasmide waren deutlich größer als pBR322. Deshalb wurde, gemäß dem ausgearbeiteten Protokoll, die Transformation mit chimärem Plasmid im großen Stil durchgeführt (siehe Methoden 31c). Nach einem Waschschrift zur Entfernung von DMSO-Resten wurden die Zellen auf Tetrazyklinplatten ausplattiert und bei 37°C zwischen 8-12h bebrütet. Sobald die ca. 500 Kolonien pro Platte eine Größe zwischen 0,1-1mm Durchmesser erreicht hatten, wurden sie auf Nitrozellulosefilter überstempelt. Von jedem Filter wurden zwei Replika angefertigt; das erste und das dritte Filter waren für die Koloniehybridisierung gedacht, während das zweite Filter bei -70°C eingefroren wurde. Zur Überprüfung der gewählten Bedingungen für die Koloniehybridisierung und der Stringenz der Waschprozedur wurde auf zwei mit cDNA-Klonen bewachsene Filter zusätzlich der cDNA^{mNGF}-Klon von J. Scott als positive Kontrolle aufgetragen. Die Filter wurden kurzzeitig zum Anwachsen des Klons bei 37°C inkubiert; die Bakterien wurden daraufhin mit NaOH lysiert, und die DNA wurde durch Backen an Nitrozellulose gebunden. Die Hybridisierung der Filter erfolgte in 5x SSC, 50% Formamid und 5x Denhardts über Nacht. Als Hybridisierungsprobe diente für das eine Filter das nicktranslatierte ca. 900bp lange PstI Restriktionsfragment von pMN mit einer spezifischen Aktivi-

tät von $8 \cdot 10^6$ cpm/ μ g. Es wurde mit 400.000cpm/2,5ml überschichtet und bei 30°C inkubiert. Das zweite Filter, ganz analog behandelt, hybridisierte jedoch bei 10°C mit dem 18mer Oligonukleotids NGF 1 (siehe Anhang A-2), welches für eine Aminosäuresequenz nahe dem C-Terminus von β NGF kodiert. Die spezifische Radioaktivität dieser Probe betrug ca. $3 \cdot 10^5$ cpm/ μ g. Beide Filter wurden in 2xSSC, 0,1% SDS erst bei Raumtemperatur und anschließend bei 50°C für 15min gewaschen. Das mit dem Oligonukleotid hybridisierte Filter wurde zu diesem Zeitpunkt entnommen, kurz gespült und autoradiographiert. Der andere wurde in 50°C erwärmtes 0,1xSSC für

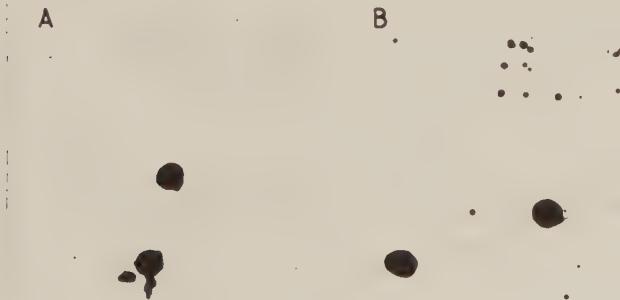


Abb 5-8: Optimierung des Signal-Hintergrund-Verhältnisses für die Koloniehybridisierung

Auf einen Filter mit Rinder cDNA-Klonen wurde zusätzlich der Klon mit pMN Plasmid aufgetragen. Für die Hybridisierung wurde das Pst I Fragment von pMN (A) und das 18mer Oligonukleotid NGF 1 (B) verwendet (techn. Details siehe Material und Methoden).

30min transferiert und vor der Autoradiographie noch zusätzlich im gleichen Puffer bei 60°C gewaschen. Mit diesen Bedingungen ließ sich in beiden Fällen ein sehr zufriedenstellendes Signal-Hintergrund-Verhältnis erzielen (Abb.5-8) und konnte deshalb unverändert für das "Screenen" der gesamten cDNA- Bank übernommen werden. In der Bank konnte ein

positiver Klon gefunden werden (Abb.5-9), der sich auf dem Filterduplikat bestätigen ließ. Diese mutmaßlich positive Bakterienkolonie und ihre Umgebung wurden von der Platte abgepickt, in Mikrotiterplatten überführt und mit einem vielzähligen Stempel auf NC-Filter übertragen. Die angewachsenen Klone wurden durch Koloniehybridisierung erneut getestet, wobei als Hybridisierungsproben das Oligonukleotid NGF 1 und zwei Restriktionsfragmente mit überlappender Sequenz (das 900bp lange PstI Fragment und das HhaI prä-NGF-Fragment, siehe hierzu A-1) Verwendung fanden. Erwartungsgemäß führte der zweimal aufgetragene Rinder NGF-Klon mit dem ^{32}P markierten PstI Restriktionsfragment zu einem positiven Hybridisierungs-

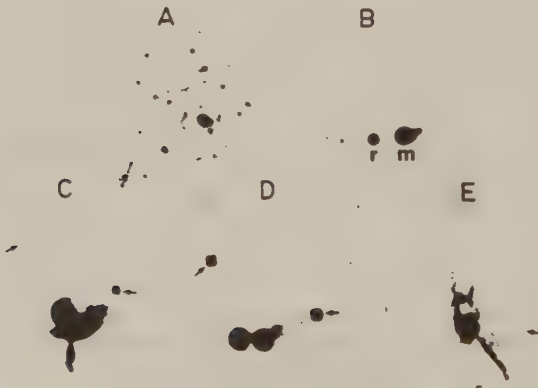


Abb.5-9: Identifizierung eines $\text{cdNA}^{\text{bNGF}}$ Klonen in der Bank von Glandula vesiculosa des Stieres

Aufleuchten eines cdNA Klonen nach Hybridisierung mit Pst I Fragment von pMN (A); Rehybridisierung der Kolonien nach Überführung der Klone in Mikrotiterplatten mit gleicher Probe (C beachte Pfeile), mit Oligonukleotid NGF 1 (D) und mit Hha I prä-NGF Fragment (E). Die tief schwarzen Signale auf C,D,E sind positive Kontrollen ($\text{cdNA}^{\text{mNGF}}$ -Klon). Filter B zeigt den $\text{cdNA}^{\text{bNGF}}$ -Klon (r) aus C im Vergleich zum $\text{cdNA}^{\text{mNGF}}$ -Klon (m) und zu zwei weiteren, zunächst als positiv eingeschätzten Klonen der Rinder Bank.

signal (Abb. 5-9C); gleiches galt auch für oligo NGF 1 (Abb. 5-9D). Mit dem fast 600bp langen HhaI prä-NGF Fragment hybridisierte jedoch nur einer der beiden Klone (Abb. 5-9E oben links). Durch dieses unerwartete Ergebnis aufmerksam geworden, wurden beide Klone getrennt auf Einzelkolonien ausgestrichen und jeweils von vier Einzelkolonien Plasmide nach Birnboim (1983) präpariert. Nach dem PstI Verdau wurden die acht Plasmide im Agarosegel analysiert (Abb.5-10). Bis auf einen Klon konnte aus allen anderen ein definiertes

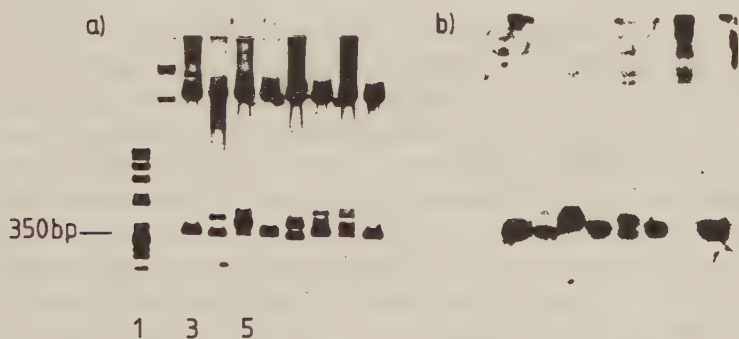


Abb. 5-10: Analyse des klonierten cDNA^{bNGF}-Inserts

Aus acht Einzelkolonien des positiven Klon wurde das Plasmid isoliert und mit Pst I restringiert (a). ϕ X Hae III DNA Marker (1); pBR322 (2); pBN10 (3); pBN11 (5).- Oligo NGF1 hybridisiert im Southern Blot an ein Fragment von ca. 350bp Länge (b). Eine Einzelkolonie scheint, die eukaryotische DNA verloren zu haben.

PstI-Fragment von ca. 350bp herausgeschnitten werden; ein Klon enthielt offensichtlich eine gemischte Plasmidpopulation mit zwei unterschiedlich langen Inserts, und ein anderer ein Insert von ungefähr 400bp. Zusätzliche, schwächere Restriktionsbanden im Gel zeigten in der Southern Analyse kei-

ne komplementären Sequenzen mit NGF (Abb.5-10); prä-NGF Sequenzen konnten mit der gleichen Technik in keinem Plasmid bestätigt werden. Zwei cDNA-Plasmide, einer mit kürzerem, der andere mit längerem Insert wurden in den Empfängerstamm Hb 101 umklont und von diesem Zeitpunkt als pBN10 und pBN11 bezeichnet.

5.3.4. Restriktionskartierung mehrerer cDNA-Klone

Neben der gerade beschriebenen cDNA-Bank ist mit der mRNA desselben Gewebes, in Zusammenarbeit mit A.Shaw und R.Heumann, eine weitere Bank konstruiert worden. Diesmal wurde jedoch das Verfahren von Heidecker-Messing angewandt, eine der beiden jüngst publizierten Vektor induzierten Klonierungsmethoden, von denen man sich lange cDNA-Inserts mit Konservierung des 5'Endes der mRNA erhofft und die eine gute Effizienz bezogen auf die eingesetzte poly(A)⁺ RNA aufweisen (siehe A-6). Aus 60.000 Transformanten konnten 4 cDNA^{bNGF} Klone isoliert werden. Zwei Klone, welche die längsten Inserts enthielten, sollen hier an Hand ihrer Restriktionskarten vorgestellt werden, da sie in erster Linie für die Sequenzierung herangezogen wurden. Der Klon pBN4 besitzt eine Insertlänge von fast 1300bp, und pBN20 dürfte mit seinen 1500bp Fremd-DNA für das volle Transkript kodieren (siehe 5.2.2.). Beide Inserts befinden sich im pUC9, ein chimäres Plasmid aus pBR322 Anteilen und den funktionellen Sequenzen der M13 mp Familie. Außer Eco RI schneidet kein weiteres Enzym der Polylinkerregion des Vektors das Insert beider Klone. Wegen dieser gemeinsamen Schnittstelle war die Lage von Eco RI am 3'Ende der mRNA schon ziemlich sicher; eine Southern Analyse mit oligo NGF 1 brachte den experimentellen Beweis hierzu (Daten nicht gezeigt). Mangels geeigneter Restriktionsschnittstellen blieben, als einzige aussichtsreiche Möglichkeiten, für die Subklonierung des Inserts in kleinere

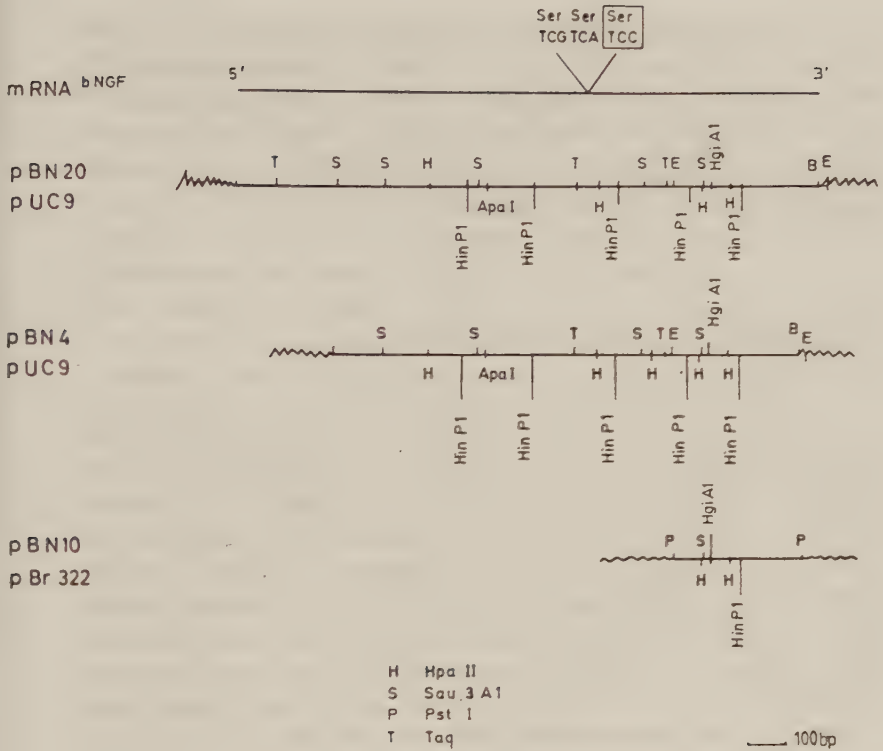


Abb.5-11: Restriktionskarten der isolierten Rinder NGF cDNA-Klone

Die Apa I Restriktionsstelle liegt im Gegensatz zur Spezies Maus wenigstens um 200b weiter vom 5'Ende der mRNA entfernt.

Fragmente nur noch die Acc I und die BamHI Site der Polylin-ker Region von M13 mp9, vorausgesetzt man will eine stumpf-
endige Ligation der DNA umgehen. Aus diesem Grunde wurde
eine Restriktionsanalyse für die Enzyme Sau 3A, Hpa II,
Hin P1 und Taq I durchgeführt, wobei als Techniken Southern
Blots, Endmarkierungen, Subverdaus, Sequenzdaten von pBN10
(A-10) und die Kartierungsmethode nach Smith und Birnstiel
(1976) zur Anwendung kamen. Das Ergebnis dieser Analyse ist

in Form einer Gegenüberstellung der drei pBN-Klone in Abb. 5-11 mit ihren multiplen und singulären Restriktionsstellen Hgi Al, Eco RI, Apa I und den beiden flankierenden Sites Hind III und Bam HI dargestellt. Die kurze Peptidsequenz NH₂-Ser-Ser-Ser- dient als Orientierungshilfe und stellt den Aminoterminus vom biologisch aktiven Rinder-NGF dar.

6. Chemische und Dideoxy Sequenzierung

Die chemische Sequenzierung nach Maxam und Gilbert (1977) und das M13 Sequenzierungssystem (Messing et al. 1977) sind die beiden am häufigsten benutzten Methoden, wobei die enzymatische DNA-Sequenzierung bei langen Sequenzen unbestritten schneller zum Ziel führt. Dieses Sequenzieren durch Kettenabbruch beruht auf der enzymatischen Verlängerung eines Primers an einer einzelsträngigen DNA-Matrize, in Gegenwart von jeweils einem der vier zugesetzten Didesoxynukleotiden, in einer für die DNA-Synthese notwendigen Desoxynukleotidmischung. Da das letztgenannte Verfahren am besten mit einzelsträngiger DNA funktioniert, haben die filamentösen Bakteriophagen von E.coli, besonders M13, beträchtlich an Bedeutung gewonnen und sind in den letzten Jahren zu sehr vielseitig verwendbaren Klonierungsvektoren entwickelt worden. Auch noch in den nächsten Jahren werden diese Vektoren für die Sequenzierung unentbehrlich bleiben, doch sie haben durch die Konstruktion einer neuen Plasmidfamilie (pEMBL) mit Polylinkerregion, Antibiotika-Resistenzmarker und der Potenz von doppelsträngiger DNA in einzelsträngige überzugehen, Konkurrenz bekommen (Dente et al. 1983). Die erweiterte Familie (pEMBL Y, pEMBL ex) ist sogar so konzipiert, daß Vorhaben der Sequenzierung, der "site-directed mutagenesis", der Genexpression und sogar des DNA-Transfers zwischen E.coli und Hefe möglich werden (Dente et al. 1985).

Die nichtlytischen M13-Phagen bilden während ihrer Vermeh-

rung im Bakterium Phagenpartikel mit theoretisch unbegrenztem Fassungsvermögen für einzelsträngige DNA, die aus den Wirtszellen ins Medium ausgeschleust werden und deshalb eine ideale Quelle für einzelsträngige DNA darstellen. Welche bequeme Möglichkeit dieses biologische System bietet, wird deutlich an Hand der wenig verwendeten physikalisch-chemischen Methoden der Einzelstrangerzeugung durch Gleichgewichtszentrifugation von λ -Klonierungsvektoren (Goodman et al. 1980) oder durch Affinitätschromatographie spezieller Plasmide (z.B. pK H47) mit einer poly(dA):poly(dT) Region (Hayashi 1980). Für begrenztere Sequenzierungsvorhaben sind die beiden enzymatischen Verfahren der Einzelstrangerzeugung durch Exonuklease III (Smith 1979) und durch DNase bei der sogenannten "Nicktranslation"-Sequenzierung (Maat und Smith 1978) recht geeignet; beide Techniken spielen aber auch in ihrem Anwendungsbereich neben dem M13-System nur eine untergeordnete Rolle. Zunehmend an Bedeutung gewinnt dafür aber die Didesoxysequenzierung am Plasmid-Doppelstrang (Wallace et al. 1981), nicht zuletzt auch durch den leichteren Zugang zu spezifischen Oligonukleotiden dank der automatischen DNA-Synthese.

6.1. Umklonierung von Restriktionsfragmenten in M13 mp Vektoren

Das cDNA-Insert von pBN10 konnte mit PstI aus pBR322 herausgeschnitten werden und ist für die Umklonierung durch präparative Gelelektrophorese (siehe Methoden unter 23.) gereinigt worden. Um die Klonierungseffizienz zu verbessern, wurde der mit PstI restringierte M13 mp10 zuvor zusätzlich mit alkalischer Phosphatase behandelt, um eine Rezyklisierung des Vektors während der Ligasereaktion zu vermeiden (siehe Methoden unter 38.). 100ng linearisierter Vektor wurde mit einem 40fachen molaren Überschuß an Fragment (ca.

350bp) über Nacht bei langsamen Abkühlen von 15°C auf 6°C in einem Thermogefäß ligiert (Straubinger persönliche Mitteilung). Als Kontrolle für die Funktion der Ligase fungierte mit PstI geschnittener Vektor und zur Überprüfung der Vollständigkeit der Phosphatase-Behandlung linearisierte, dephosphorylierte Vektor-DNA ohne Zusatz des Restriktionsfragments, dafür aber mit Ligase im Ansatz. Nach der Transformation von JM 103 Zellen mit Aliquoten dieser Ligationsansätze konnten mehrere farblose Plaques isoliert werden, die wegen der Insertion von Fremd-DNA zur α -Komplementation der defekten Galaktosidase des Bakteriums nicht mehr in der Lage waren (Langley et al. 1975). Insgesamt sechs dieser Rekombinanten wurden von der Platte abgepickt und nach der Präparation ds Phagen-DNA (siehe Methoden 36.) mit PstI restringiert. Vier Rekombinanten mit Inserts der ursprünglichen Länge konnten mittels Gelelektrophorese bestimmt werden. Die Orientierung des Fragments in den einzelnen Klonen, welche für die spätere Sequenzierung von Interesse ist, konnte durch die Hybridisierung von radioaktiv markierten oligo NGF1 (siehe Methoden Pkt.21.) an die jeweilige einzelsträngige Phagen-DNA festgestellt werden. Trägt nämlich das einzelsträngige Virus eine zur mRNA komplementäre Sequenz, so kann das spezifische Oligonukleotid nicht binden, und im Dot-Blot findet man nur eine Hybridisierung an die ds DNA dieses Rekombinanten (Daten nicht gezeigt). Mit diesem Verfahren konnten zwei Phagen mit antiparallelen Inserts identifiziert und einzelsträngige DNA für die Sequenzierung bereitgestellt werden. Darüber hinaus wurde das 900bp lange Hind/Eco Fragment von pBN4 (siehe Restriktionskarte Abb.5-11) durch gerichtete Klonierung in M13 mp9 eingebracht. Mit dem universellen 17 Basen langen M13 Primer kann somit in Richtung 3'→5' der mRNA sequenziert und vorrangig die gewünschte Sequenz des maturen NGFs ermittelt werden. Parallel dazu war es notwendig gewesen, auch das Eco/Eco-Fragment (siehe Karte) in M13 zu überführen, da im pBN10 die interne Eco RI Site bereits nicht mehr vorhanden ist. Im einzelnen wurde für diese Umklonierung, nach der Linearisierung der

Vektor-DNA mit zwei bzw. einem Restriktionsenzym und alkalischer Phosphatase-Behandlung, 100ng M13 mp9 DNA mit einem abgeschätzten 6-60fachen überschuß an Insert über Nacht ligiert (siehe oben) und in JM 101, nach Dagert und Ehrlich, transformiert. Die meisten weißen Plaques ließen sich bei einem 8-10fachen molaren überschuß erzielen. Die Plasmid-DNA von pBN4 stammt aus dem E.coli K12 MC 1061 und ist deshalb methyliert, weil der Stamm noch über ein funktionstüchtiges EcoK Modifikationssystem verfügt. Dieser Umstand ermöglicht die risikolose Transformation in den restriktionspositiven Stamm JM 101. Tatsächlich konnten beide Fragmente in ihrer ursprünglichen Länge in den rekombinierten M13 Phagen wiedergefunden werden. Die Orientierung des EcoRI Fragments im Vektor wurde diesmal über "T-Tracking" ermittelt. Vergeblich waren die Bemühungen, das 1500bp lange Hind/Bam Fragment von pBN20 umzuklonieren. Es konnten zwar Rekombinanten gefunden werden, doch sie enthielten weder das gewünschte Insert, noch konnte durch Southern Analyse NGF spezifische Sequenzen aufgefunden werden.

6.2. Chemische und enzymatische Sequenzierung von Rinder-NGF

Die aus dem pBN10 hervorgehenden M13 Klone, M13 mp10/1 und M13 mp10/3, sind für die Didesoxysequenzierung am problematischsten, enthalten sie doch neben einem poly(dA)- und einem poly(dT) Schwanz am Ende des Inserts auch noch beidseitig oligo(dG) und oligo(dC), die auf das komplementäre, homopolymere "Tailing" von Vektor und cDNA zurückzuführen sind. Da diese komplementären Regionen nur ein paar hundert Basen voneinander entfernt liegen, wäre eine Auffaltung des Einzelstranges denkbar. In diesem einfachsten angenommenen Fall einer Sekundärstruktur würde die Klenow-Polymerase die Sequenz des Inserts einfach überspringen und nur Vektorsequenzen ablesen.- Die Stereochemie einer Folge von dGs

(Gellert et al. 1962) in der Matrize soll angeblich ganz besonders für das Enzym eine Barriere darstellen und sich im Sequenzgel durch eine oder mehrere dicke Banden, über alle vier Spuren hinweg, bemerkbar machen. Im Fall des M13 mp10/1 muß das Enzym bei der Verwendung des universellen Primers eine Folge von dCs überwinden, die Folgen des "G-stacking" Phänomens sollten also möglicherweise sogar ausbleiben. Im M.R.C.-Laboratorium in Cambridge hat man zur Destabilisierung störender Sekundärstrukturen die Magnesiumkonzentration im Annealing Puffer von Primer und Matrize gesenkt und damit gute praktische Erfahrungen erzielt (u.a. Winter u. Coulson). Der Puffer enthält 10mM Magnesiumionen und die Konzentration kann, wie später gezeigt wird, weiter gesenkt werden bis gerade eben noch eine effektive Bindung des Primers an die Matrize möglich ist. Mit dieser empfohlenen Ionenkonzentration sind die vier Reaktionen für die Kettentermination mit M13 mp10/1 als Matrize und dem kommerziell erhältlichen universellen Primer, als auch mit dem schon früher verwendeten, über HPLC gereinigten Oligonukleotid NGF1, der innerhalb des cDNA-Inserts bindet, durchgeführt worden. Die "Annealing" Reaktion von Primer und Matrize erfolgte für 1h bei 55°C. In Abb. 6-1 ist das Autoradiogramm dieses Experiments gezeigt. Mit dem universellen Primer kann tatsächlich, stromaufwärts der kurzen Polylinker Sequenz des Vektors, der oligo(dC)- und der poly(dA) Schwanz des Inserts abgelesen werden; der obere Teil des Sequenzgels ist jedoch wegen des Auftretens breiter Banden in den einzelnen Spuren untypisch und dürfte die Folge von Sekundärstrukturen sein. Mit dem spezifischen Primer (Abb. 6-1) konnten aus diesem und anderen Sequenzgelen ca. 50 Basen bis zu der störenden Sekundärstruktur gelesen werden, jenseits derer die Sequenz nicht weiter zu verfolgen war (Abb. 6-1). Durch eine Verminderung der Magnesiumkonzentration können solche Sekundärstrukturen weiter destabilisiert werden. Deshalb wurde in einem Pilotexperiment die "Priming" Reaktion bei drei verschiedenen Mg^{++} -Konzentrationen durchgeführt, und zusätzlich noch die Matrize, vor Zugabe des Primers durch 2-minütiges Kochen und

ct gactgactga



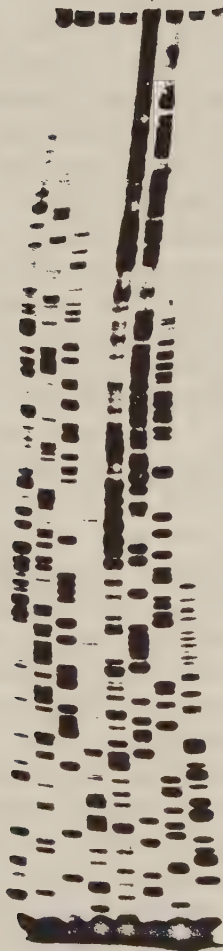
Abb. 6-1: Sequenz von M13 mp10/1

Das Pst I Fragment von pBN 10 wurde in M13 mp10 umklontiert. Mittels des universellen M13-Primers, als auch mit dem spezifischen Primer oligo NGF1 wurde in 5'Richtung der mRNA sequenziert.

rasches Abkühlen in einem Äthanolbad (-20°C), denaturiert. Unter diesen Bedingungen wurde die Elongation des Stranges über diesen Stopp hinaus möglich, wenn auch die Unlesbarkeit der Sequenzleiter im unmittelbaren Bereich des Blocks bestehen blieb (Anhang A-9b). Bei nur 2mM Mg^{++} im "Annealing" Ansatz ist bei den sonst gewählten Bedingungen (Methoden siehe Pkt.40) offensichtlich eine Bindung des Primers an die Matrize nicht mehr möglich (A-9a), oder aber die Reaktionsgeschwindigkeit der Hybridisierung ist erheblich reduziert. Die jetzt lesbar werdende Sequenz, jenseits dieses Polymerasestopps, stammt nun nicht mehr von klonierter Rinder-DNA, sondern stellt die Sequenz des Vektors stromaufwärts der PstI Stelle dar (A-9b). Auch beim Sequenzieren des Gegenstranges durch die Zuhilfenahme von M13 mp10/3 und des universellen Primers, stieß man auf eine etwas weniger ausgeprägte Sekundärstruktur, jenseits derer das Lesen der Sequenz ziemlich erschwert war (Daten nicht gezeigt). Insgesamt konnten von pBN10 ca. 100 Basen sequenziert werden, die das carboxyterminale Ende von NGF kodieren, und es schien, wegen der so gut wie ausgeschöpften Kodierungskapazität des Klons (ca. 180b nichtkodierendes 3'Ende, 80b poly(dT), 20b dGs, 100 Basen kodierende Sequenz insgesamt also über 350 Basen), dem Aufwand nicht gerecht durch entsprechende Maßnahmen, möglicherweise von der Polymerase übersprungenen Sequenzen nachzuspüren.

Die hier beschriebenen Schwierigkeiten, G:C reiche Regionen zu sequenzieren sind ein allgemeines Problem (siehe z.B. Karanthanis 1982) und führen in den Autoradiographien zu den auch hier aufgezeigten "pile ups". Die bisher nicht erfaßten Sequenzbereiche am Carboxyterminus wurden durch Sequenzierung des Eco RI-Fragments ermittelt, wobei zuvor durch "T-tracking" ein Klon ausgewählt wurde, der keine poly(dT) Leiter in der Sequenz besaß und damit eine Ketten-termination in Richtung auf die 3' nichtkodierende Region der mRNA ermöglichte. Bei dieser Sequenzierungsarbeit kam auch die Technik der Puffergradienten-Sequenzgele (Biggin et al. 1983) mit zur Anwendung (Abb. 6-2), die über große Be-

ct a q c t a q



Hind/Eco Eco/Eco

Abb. 6-2: Sequenzgel der cDNA von bNGF

Das Hind III/Eco RI und das Eco RI Fragment von pBN4 wurden in M13 mp9 umklontiert und stromaufwärts bzw. -abwärts der Eco RI Schnittstelle didesoxysequenziert (siehe auch Restriktionskarte Abb. 5-11).

reiche des Gels eine äquidistante Basenauftrennung möglich macht. Die Basen der Eco RI Stelle - der Übergang also von Vektor-DNA zur Rindersequenz - und die unmittelbar benachbarten Basen ließen sich mit dem hier verwendeten Gradientengel (siehe Methoden 42.) nicht bestimmen. Sie konnten jedoch bis auf das erste G dieser Schnittstelle mit einem üblichen 20%igen Sequenzgels erfaßt werden. Auf die gleiche Weise wurde mit dem umklonierten Hind/Eco-Fragment von pBN4 verfahren, und es glückte, eine lückenlose Sequenz bis zum Aminoterminal von Rinder-NGF mit seinen drei aufeinanderfolgenden Serinen zu erstellen. Nahezu gleichzeitig gelang auch die chemische Sequenzierung durch 5'Endmarkierung (siehe Methoden unter 21., 33.) der entsprechenden Restriktionsfragmente und der Ausnutzung der singulären Restriktionsschnittstellen im pUC9. Für die Sequenzierung des kleineren der beiden Fragmente wurde das Plasmid mit Eco RI linearisiert, dephosphoryliert, und 6pmol Enden wurden kinasiert. Nach der radioaktiven Markierung wurde der gesamte Restriktionsansatz über Nacht mit Bam HI nachgeschnitten, um die beiden 5'markierten Enden des doppelsträngigen Eco RI-Fragments voneinander zu trennen. Über präparative Gelelektrophorese und Elektroelution konnte schließlich das einseitig markierte Fragment isoliert und den chemischen Reaktionen zugänglich gemacht werden. Für die partielle Sequenzierung des Hind/Eco Fragments wurde ganz analog verfahren, mit dem einzigen Unterschied, daß nun mit HindIII über Nacht nachgeschnitten wurde. Die Überlappung beider Sequenzen kam durch 3'Endmarkierung der singulären HgiAI-Stelle und durch Nachschneiden des HgiAI/HindIII Fragments mit ApaI zustande. Die an der chemischen Sequenzierung beteiligten Schnittstellen sind zur besseren Übersicht nochmals in Abb. 6-3 zusammen mit den Sequenzierungsrichtungen dargestellt.

Auch die Umgebung der ApaI-Site, die anfänglich nicht in der Vorläufersequenz vermutet wurde, ist stromaufwärts und stromabwärts über eine kürzere Entfernung ansequenziert worden. Aus den Daten der chemischen und der Didesoxysequenzierung ergab sich dann die in Abb. 6-4 dargestellte Rinder-



Abb. 6-3: Verwendete Restriktionsschnittstellen und Richtung der chemischen Sequenzierung der cDNA von bNGF.

NGF Sequenz, die den beiden anderen Spezies Mensch und Maus gegenübergestellt wurde. Im Anhang (A-11) sind die Vorläufersequenzen der drei Spezies zu finden, soweit sie bisher bekannt sind.

6.3. Vergleich der NGF Sequenzen von Maus, Mensch und Rind

Die aus der genomischen DNA abgeleitete Aminosäuresequenz für menschlichen NGF wies, verglichen mit dem auf Proteinebene charakterisierten Mäuse-NGF, eine Homologie von 90% auf. Diese große Konservierung bei beiden Spezies schien sich dabei gar nicht so recht mit den immunologischen Unterschieden von Mäuse- und Rinder-NGF vereinbaren zu lassen, die eine gegenseitige Immunpräzipitation unmöglich machen (Harper et al. 1983). Angesichts dieser Diskrepanz wurde eine Verallgemeinerung des aufgefundenen hohen Grades an Homologie für alle Säuger-NGFs untereinander in Frage gestellt. An Hand des ansequenzierten Aminoterminus von bNGF wurde unter der Annahme, daß diese Region repräsentativ für das gesamte Protein ist, eine Homologie für Maus/Rind von über 80% vorausgesagt. Diese Annahme ließ sich nun durch die hier beschriebene vollständige Sequenzierung von bNGF im großen und ganzen bestätigen. Die aufgefundene Homologie beträgt

```

                                -10                                1
asp phe cln ala his gly thr ile pro phe asn arg thr his arg ser lys arg ser thr his pro val phe his met
GAC TTC CAG GCC CAT GGT ACA ATC CCT TTC AAC AGG ACT CAG CGG AGC AAG CGC TCA TCC ACC CAC CGA GTC TTC CAC ATC m
      glu val gly      ala ala
      G   T  GG      G T CC      C
                                A                                G   A T      T   C A   .   arg G
                                A                                G   G   A T      C   T   arg CG b

10                                20                                30
gly glu phe ser val cys asp ser val ser val trp val gly asp lys thr thr ala thr asp ile lys gly lys glu val
GGG GAG TTC TCA GTG TGT CAC AGT GTC AGT GTG TGG GTT GGA GAT AAG ACC ACA GCC ACA GAC ATC AAC GGC AAG CAG CTC m
      C   A           G           C           G           C           C           h
      G           G           C A   C           G   C           A   G           G           b

40                                50                                60
thr val leu ala glu val asn ile asn asn ser val phe arg gln tyr phe phe glu thr lys cys arg ala ser asn pro
ACA GTG CTG CCC CAG GTG AAC ATT AAC AAC ACT GTA TTC ACA CAG TAC TTT TTT GAG ACC AAG TGC CGA GCC TCC AAT CCT m
      met      gly      lys
      TG   T   GA      A
      TC   C   GA      C           A           G   A   C   C   C   b

70                                80                                90
val glu ser gly cys arg gly ile asp ser lys his trp asn ser tyr cys thr thr thr his thr phe val lys ala leu
GTT GAG ACT GGG TGC CGG GGC ATC CAC TGC AAA CAC TGG AAC TCA TAC TGC ACC ACG ACT CAC ACC TTC GTC AAG GCG TTC m
      asp
      C   C           T           A   G           T   T           T           C   h
      G   C   C           A   C           ala G G   Q           T   G   T   C           C           b

100                                110
thr thr asp glu lys gln ala ala trp arg phe ile arg ile asp thr ala cys val cys val leu ser arg lys ala thr
ACA ACA GAT CAG AAG CAG GGT TGG AGG TTC ATC CGG ATA GAC ACA GCC TGT GTG TGT CTG CTC AGC AGG AAG GGT ACA m
      met      gly
      C   TG   GC           C   C   T           T   G           val
      C   TG   .C   GC           C   C   C   C           C   C   G   C           thr gly
      A   GGC b

arg arg gly op
AGA AGA GGC TGA cttgcctgca gc cccctccccacgtgccccctccacactctctctgggccccctccctacctcagcctgttaaatatttttaaa t m
      ala
      C   cctgcgcgacacgc tccct cccc ctgccccctctacactctctctggg ctccctacctcaacctgttaaatatttttaaa t h
      gln
      CAG   C   cctgcgcg ca gcccccaacccctccc ggctccccctctacactctctctgccccctccctacctcaacctgttaaatatttttaaaact b
tataaggactgcattgataatttatagttttatacaatttttaaga cattattttataaattttcaagcatcctgtata m
tataaggactgcattgataatttatagttttatacaagtttttaagaatcattattttataaatttttgaagcatcctgtgtg h
tataaggactgcattgataatttatagttttatacaagtttttaact a c ttatttttaa b

```

Abb. 6-4: Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz vom biologisch aktiven NGF der Spezies Maus (m) (Scott et al. 1983), Mensch (h) (Ullrich et al. 1983) und Rind (b).

85% bei Bewahrung aller Cysteine und ist damit niedriger als bei Mensch und Maus (Abb. 6-5). Werden die DNA-Sequenzen der δ -Untereinheit von Mensch/Maus und Mensch/Rind miteinander verglichen, so hat beidesmal im gleichen Ausmaß Basenaustausch stattgefunden, doch ist die Homologie auf Proteinebene zwischen Mensch und Rind größer (Abb. 6-5). Wegen der aufgezeigten, allgemein hohen Konservierung des NGF-Proteins bei den hier untersuchten Säugern kann das gesuchte aktive Zentrum des Moleküls nicht eindeutig lokalisiert werden. Im einzelnen lassen sich zwei Regionen (66-91; 41-59) mit einer Länge von ca. 20 Aminosäuren aufzeigen, die nur einen einzigen Austausch aufweisen, wobei es sich um den Übergang von Serin nach Alanin und von Arginin nach Lysin handelt. Das carboxyterminale Ende des Proteins (95-115), mit Ausnahme der endständigen Aminosäuren, ist ebenso wie Region 19-36 vollständig konserviert. Zusammengenommen machen diese Regionen mehr als 60% des gesamten, reifen Proteins aus, und

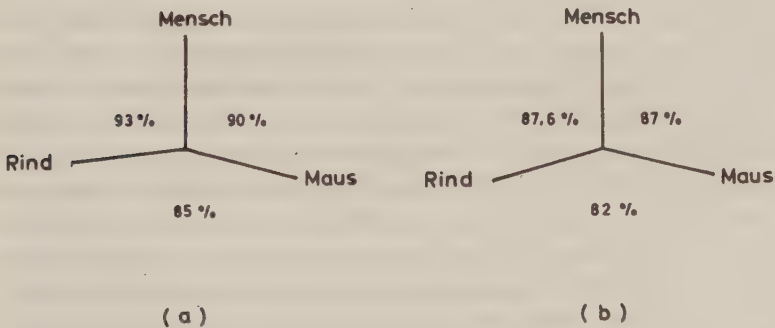


Abb. 6-5: Homologievergleich der NGF Sequenzen von Rind, Maus und Mensch auf Protein- und DNA-Ebene

Angegeben ist der Grad an Homologie des murenen Proteins bei Mensch, Rind und Maus (a). Obwohl auf DNA-Ebene Rind und Maus gleichweit von der menschlichen Sequenz entfernt sind (b), steht das Rinder NGF Protein dem menschlichen Faktor offensichtlich phylogenetisch etwas näher.

es dürften wohl kaum alle diese konservierten Reste an der gesuchten Bindungsstelle für den Rezeptor beteiligt sein. Es ist jedoch gut vorstellbar, daß einige für die durch Zn^{++} stabilisierte, nicht kovalente Proteininteraktion der NGF Monomere von Bedeutung sind und das extrem in Richtung des Dimers verschobene Gleichgewicht dieser Assoziation begünstigen.

Bis heute ist unklar, inwieweit neben dem dimeren Molekül auch das Monomer biologische Aktivität besitzt. Durch die kovalente Verknüpfung der Untereinheiten von NGF mit Dimethylsuberimidat konnte der klare Beweis für die biologische Aktivität des Dimers erbracht werden (Stach und Shooter 1974). Aus diesem Grund erscheint es nicht unwesentlich, sich stets des dimeren Charakters von NGF bei den Überlegungen zum aktiven Zentrum bewußt zu sein. Zwei der als besonders konserviert aufgefallenen Regionen, nämlich 66-91 und 19-36, sollten vielleicht zunächst etwas zurückgestellt werden, überlappen sie doch mit dem sogenannten "Revoltella" Fragment (10-25/75-88), einem unsymmetrischen Cystinpeptid, dem biologische Aktivität nachgesagt wurde (Mercanti et al. 1977). Doch diese Befunde galten schon immer als sehr umstritten und erwiesen sich als nicht reproduzierbar. Nach der vollständigen in vitro Synthese dieses Peptids (Wünsch 1985) konnte nun endlich überzeugend seine Inaktivität im biologischen Test gezeigt werden (persönliche Mitteilung G. Harper). Hinter dem "Revoltella" Fragment verbirgt sich jedoch ein ganz wesentlicher Gedanke, der beim Vergleich der verfügbaren Primärstrukturen nicht unbeachtet bleiben sollte. Die gesuchte Rezeptorbindungsstelle muß nicht notwendigerweise ein konsekutives Peptid wie z.B. die Hauptrezeptorbindungsstelle von EGF sein (Komoriya et al. 1984). Das aktive Zentrum von NGF könnte genauso gut durch Reste definiert sein, die durch die Tertiärstruktur des Proteins in räumliche Nähe zueinander gebracht werden. Für die Stabilisierung der dazu notwendigen räumlichen Struktur könnten die drei eingangs erwähnten Disulfidbrücken im Protein verantwortlich sein. Für diese Hypothese spricht der experimentel-

le Befund, daß reduzierter NGF biologisch inaktiv ist und nicht mehr retrograd transportiert werden kann (Stoeckel et al. 1975). Die Bedeutung der Cysteine für das NGF-Molekül mag auch an deren fixen Positionen in der Primärstruktur des Proteins von Mensch, Maus und Rind erkennbar werden und am gleichfalls unveränderten Cysteingehalt bei Kobra und Meer-schweinchen (Hogue-Angeletti et al. 1976; Rubin et al. 1981). Beim Schlangen NGF sind die Cysteine an Position 108 und 110 bestätigt worden, während die Existenz eines weiteren Cysteins (entspricht Position 58 bei Maus) durch Ansequenzieren eines tryptischen Peptids als sehr wahrscheinlich gilt. Trotz gewisser Unsicherheit bei der Zuordnung eines weiteren Peptids zur Maus NGF Sequenz, dürfte auch Cystein 68 bei Kobra konserviert sein, zumal Cystein 110 seine Disulfidbrücke hierher schlagen sollte (siehe hierzu auch Abb. IV-3).

Chemische Modifikationsstudien an den Tryptophanen haben deren Beteiligung an der Interaktion von NGF mit seinem Rezeptor wahrscheinlich gemacht. So führt die Modifikation von Trp-21 und Trp-99 durch Oxidation zu fast vollständigem Verlust der biologischen Aktivität des Moleküls und legt deshalb deren Beteiligung am aktiven Zentrum nahe (Frazier et al. 1973; Cohen et al. 1980). Die NGF-Sequenzen der drei Säuger stehen mit dieser Hypothese in Einklang, zumal diese beiden Tryptophane in den schon bereits angesprochenen streng konservierten Regionen liegen. Es sollte an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben, daß auch bei Kobra Trp-99 in der präliminären NGF-Sequenz gefunden wurde.- Eine jüngere Untersuchung aus der Arbeitsgruppe Bradshaw macht nun auch die Einbeziehung der Histidine His-75 und His-84 in das aktive Zentrum wahrscheinlich (Dunbar et al. 1984); dies sind wiederum zwei Reste, die, mit Ausnahme von His-84 bei Kobra, bei allen anderen bisher untersuchten Spezies während der Evolution streng bewahrt wurden.

Die Sequenzierung von Rinder NGF brachte noch einen unerwarteten Aspekt in Bezug auf die carboxyterminale Prozessierung

dieses Proteins. Bei Mensch und Maus endet NGF mit Arg-Arg-X. Die beiden letzten Aminosäuren werden, so die derzeitige Auffassung, in der Speicheldrüse der Maus spezifisch durch die γ -Untereinheit (siehe Einleitung unter "Vorkommen u. Biochemie von NGF") abgespalten, wobei im vermutlich hierbei sich formierenden 7S Komplex die Arginylesteropeptidaseaktivität von γ kompetitiv durch das endständige Arginin von β -NGF gehemmt wird. Inwieweit diese Prozessierung auch beim Mensch und in den innervierten Zielorganen der Maus Gültigkeit besitzt ist derzeit nicht bekannt. Beim Rind fehlt nun diese typische dibasische Prozessierungsstelle am Carboxyterminus (siehe Abb. 6-4), denn Arginin 118 ist zu Glutamin mutiert. Damit ist eine analoge Prozessierung durch ein Mitglied der Kallikreinfamilie unmöglich geworden. Auf der Proteinebene gibt es bisher aus jetzt verständlichen Gründen keine Evidenz für die Assoziation der γ -Untereinheit mit bovinem NGF (Harper et al. 1982).

Gilt das Interesse der Primärstruktur von Proteinen, so richtet sich die Aufmerksamkeit verständlicherweise in erster Linie auf den kodierenden Teil einer cDNA, und nicht-kodierende Regionen der mRNA geraten dabei in Vergessenheit oder werden, wie oft bei 5'Enden, überhaupt nicht sequenziert. Das 5'Ende der NGF mRNA ist bisher nur von Maus bekannt. Beim Menschen ist es noch nicht gelungen, dieses zu erfassen, da das 1. Exon über 12kb vom 3. Exon, welches 80% des Vorläuferproteins kodiert, entfernt liegt. Bekannt sind aber die nichtkodierenden 3'Enden von Mensch, Maus und mittlerweile auch vom Rind. Jedoch ist niemandem bisher die ausgeprägte Homologie dieser Region bei den Spezies Mensch und Maus aufgefallen, die deutlich hervortritt, sobald in beiden Sequenzen artifizielle Deletionen zur maximalen Anpassung eingeführt werden. Auch die mRNA des Rindes macht hier keine Ausnahme. 93% Homologie findet man zwischen Mensch und Rind, wenn man die eingeführten Deletionen bei dieser Kalkulation unberücksichtigt läßt. Daß diese ausgeprägte Konservierung nicht das Ergebnis eines Selektions-

druckes auf diese spezielle Region sein sollte, ist schwer vorstellbar, zumal in der Evolution die Trennung der beiden heutigen Spezies voneinander viele Millionen von Jahre zurückliegt.

IV. DISKUSSION UND AUSBLICK

Das Konzept der neurotrophen Faktoren, also von charakterisierten Proteinen, die das Überleben von Neuronen in vivo ermöglichen, stützt sich derzeit vor allem auf den Nervenwachstumsfaktor. Seine physiologische Bedeutung für sympathische und sensorische Neuronen des peripheren Nervensystems ist sehr genau dokumentiert worden.

Unlängst konnte nun in den physiologisch relevanten Orten, den Innervationsfeldern sympathischer Neurone (Korsching & Thoenen 1983; Shelton et al. 1984; Heumann et al. 1984; Korsching & Thoenen 1985) erstmals die Expression von NGF zuverlässig nachgewiesen werden. Bisher ist jedoch noch völlig ungeklärt, wie man sich die Prozessierung des primären Translationsprodukts von NGF in diesen Geweben vorzustellen hat und welche Proteasen hieran beteiligt sind. Erste Anhaltspunkte, wie die Synthese von biologisch aktiven NGF vonstatten geht, konnten durch die hier beschriebenen Untersuchungen an der Mausspeicheldrüse, dem mit Abstand wichtigsten Organ für die Isolierung von β -NGF, gewonnen werden. Jedoch muß man sich im klaren sein, daß nicht alle Aspekte der Biosynthese in der Speicheldrüse vorbehaltlos auf neurobiologisch interessante Gewebe mit extrem niedrigem NGF-Gehalt übertragen werden dürfen. Die Situation in der Speicheldrüse, einmal Proteasenreichtum, zum anderen intrazelluläre Speicherung und Sekretion in den Speichel, könnte zu Anpassungen speziell für dieses exokrine Gewebe geführt haben. Unter diesem Gesichtspunkt ist auch der HMW NGF-Komplex zu sehen, der durch die Assoziation von biologisch aktivem NGF mit zwei α - und zwei γ -Untereinheiten zustande kommt.

Bei den Untersuchungen zur Biosynthese von NGF ist nicht diese Proteininteraktion von zentraler Bedeutung, sondern die Frage, ob NGF ähnlich wie das mit ihm verwandte Insulin

(Greisow 1978) aus einem prä-pro-Molekül hervorgeht. Daß NGF tatsächlich in der Speicheldrüse synthetisiert und nicht bloß dort akkumuliert wird, ging aus der Inkorporation radioaktiver Aminosäuren in ein Molekül hervor, welches durch Antikörper gegen nativen NGF immunpräzipitierbar war (Levi-Montalcini und Angeletti 1968) und identische physikalische Eigenschaften mit gereinigtem NGF besaß (Berger et al. 1978). Mit immunocytochemischen Untersuchungen konnten schließlich die tubulären Zellen dieser Drüse als Synthesort charakterisiert werden (Schwab et al. 1976). Kinetische Studien zur Biosynthese von NGF an Gewebsstücken der Speicheldrüse führten zur Immunpräzipitation eines Moleküls von 22.000D; dieses Protein besaß drei mit NGF gemeinsame tryptische Peptide, wobei als Kriterium für die Identität eine isoelektrische Fokussierung Verwendung fand (Berger et al. 1977). Dieselben Autoren schlossen aus ihren radioaktiven Pulsexperimenten auf mögliche größere Vorstufen, die jedoch nicht vom verwendeten Antiserum erkannt wurden. In Analogie zu anderen sekretorischen Proteinen wurde u.a. auch eine aminoterminal Extension erwogen; trotz intensiver Bemühungen in zwei Labors (Thibault und Thoenen, Shooter et al. unpubliziert) gelang es jedoch nicht, das primäre Translationsprodukt von NGF im zellfreien System immunpräzipitieren (Thoenen und Barde 1980). Deshalb setzte sich immer mehr die Meinung durch, daß eine Situation vergleichbar mit Gastrin (Noyes et al. 1979) und nicht mit Insulin vorlag (Duguid et al. 1976).

Für die Identifikation dieser postulierten Vorstufen und für die geplante Immunedektion von rekombinierten cDNA-Klonen war es deshalb erforderlich gewesen, ein spezielles Antiserum herzustellen, das nicht nur den prozessierten dimeren Faktor erkennt, sondern auch das monomere Translationsprodukt. Es lag deshalb nahe, vor der Applikation das Antigen zu denaturieren und die reduzierten Disulfidbrücken zu blockieren, um auf diese Weise antigene Determinanten zu schaffen, die für ein einkettiges Vorläuferprotein repräsentativer sein sollten. Dieses Vorhaben führte auch tatsäch-

ten Schwankungen des Molekulargewichts des 18kD Proteins zwischen 16-19kD sind vermutlich auf eine unspezifische, partielle Proteolyse zurückzuführen. Die 28kD Vorstufe muß ebenfalls mit entsprechender Vorsicht interpretiert werden, weil sie sich nicht aus der cDNA-Sequenz ableiten läßt (Abb. IV-1). Der erbrachte Nachweis von gemeinsamen antigenen Determinanten von P28 mit denaturiertem NGF (siehe Abb. 1-9) macht es wahrscheinlich, daß P28 ein proteolytisches Abbau-produkt von pro-NGF (ca. 31kD) ist. Allerdings muß im Augenblick die Vorstellung eines abspaltbaren Signalpeptids bei prä-pro-NGF in Frage gestellt werden, weil der aufgefundene Aminoterminus dieses Moleküls nicht zu den bisher bekannten, prozessierbaren Signalsequenzen sekretorischer Proteine (siehe Anhang A-3) paßt. Die Abspaltbarkeit sollte jedoch experimentell überprüfbar sein durch in vitro synthetisierte mRNA^{NGF}, in vitro Translation in Gegenwart von Hunde Pankreas-Mikrosomen (Walter und Blobel 1983) und partielle Edman-Sequenzierung.

Neben diesem Teilaspekt der Prozessierung von prä-pro-NGF ist (sind) besonders die Protease(n) von Interesse, welche die Reifung des Vorläufers zum 13kD Protein bewerkstelligen kann (können). Die gleichzeitige Expression von Kallikreinen und vielen Wachstumsfaktoren wie "thymocyte transforming factor", Erythropoietin, zwei mesodermale Wachstumsfaktoren sowie EGF und NGF in der Mausspeicheldrüse, hat zu der Vermutung geführt, daß Mitglieder der Kallikreinfamilie an der Prozessierung dieser Wachstumsfaktoren beteiligt sein könnten (Anderson 1975). Diese Theorie wird durch Sequenzdaten des "EGF binding protein" und der α - und γ -Untereinheit des 7S NGF Komplexes bekräftigt (Mason et al. 1983; Ronne et al. 1983; Evans et al. 1985), weil sie die Zugehörigkeit dieser Proteasen zu den Kallikreinen aufzeigen. Auch die bereits erwähnte β NGF-Endopeptidase gehört wegen ihrer ausgeprägten Kininogenaseaktivität dieser Familie an und zeichnet sich durch ihre bemerkenswerte enzymatische Aktivität aus, β NGF zwischen His-8 und Met-9 zu spalten (Abb. IV-3). Sie komigriert in der Säulenchromatographie mit der allgemeinen

Kallikreinaktivität der Speicheldrüse (Bothwell et al. 1979) und könnte daher mit einer der drei bis vier in der Speicheldrüse exprimierten Kallikreinen identisch sein (Isackson et al. 1984). Doch bisher ist von keinem Mitglied der Kallikreinfamilie, die wenigstens 24 nicht allelische Gene enthalten soll (Evans et al. in Vorbereitung), seine Beteiligung an der Prozessierung von pro-NGF glaubhaft aufgezeigt worden. Die bisher in der Literatur beschriebene Maturierung vom 22kD Vorläufer zum reifen Produkt durch die γ -Untereinheit ist umstritten, weil unter den gewählten Versuchsbedingungen auch Trypsin die Prozessierung bewerkstelligen konnte (Berger et al. 1981) und damit vermutlich jede Serinprotease funktioniert hätte. Die Nichtbeteiligung von γ am HMW-Komplex bei *Mastomys natalensis* und beim Meerschweinchen (Fahnestock et al. 1985; Rubin et al. 1981) spricht keinesfalls gegen ihre grundsätzliche Beteiligung an der Abspaltung der pro-Sequenz von NGF. Doch bisher gibt es auch keinen einzigen Hinweis, der dafür sprechen könnte. Die NGF-Endopeptidase, ein weiterer Kandidat für die Teilnahme an der Prozessierung, ist sicherlich keine Protease, die für die Reifung unbedingt erforderlich ist, da sie weder in der Glandula vesiculosa des Rindes (Harper et al. 1982) noch in der Prostata des Meerschweinchens (Rubin et al. 1981) zu finden ist.

Jetzt, da die klonierte NGF-Sequenz zur Verfügung steht, kann durch in vitro Prozessierung von prä-pro-NGF, dessen Protein mit gentechnologischen Methoden in größeren Mengen verfügbar gemacht werden kann, die Möglichkeiten einer spezifischen Maturierung durch bereits gereinigte Proteasen untersucht werden. Eventuell kann sogar in einem heterologen Zellsystem eine bisher noch unbekannte Protease der Speicheldrüse (oder jedes anderen Gewebes) identifiziert werden durch die Prozessierung des Vorläufers in einem Komplementationstest mit rekombinierten Expressionsvektoren.

Eine ganze Reihe von Proteinen der Mausspeicheldrüse, so auch NGF, ist von einem Sexualdimorphismus betroffen, der

bereits in histologischen Schnitten an der unterschiedlichen Größe der tubulären Zellen deutlich wird (Lacassagne, A. 1940; Aloe et al. 1981). Nachdem NGF in der Speicheldrüse der Maus nachgewiesen war (Cohen 1958, Levi-Montalcini 1958), ist man schon bald auf seinen höheren Gehalt in der adulten männlichen Maus aufmerksam geworden (Cohen 1960). Die Injektion von Testosteron bei weiblichen Tieren und die Kastration von Männchen bestätigten die Vermutung der Regulation der NGF-Synthese durch Androgene (Caramia et al. 1962; Levi-Montalcini und Angeletti 1964). Heute weiß man, daß diese Art von Regulation gewebsspezifisch nur in einigen exokrinen Drüsen der Säuger erfolgt (Korsching und Thoenen 1983), und man vermutet eine für Steroidhormone übliche Steuerung auf dem Transkriptionsniveau (Scott et al. 1983). Deshalb war das Auftreten von NGF-Vorläufern in präpubertären Weibchen ziemlich unerwartet (siehe Abb. 1-7 und 1-10). In Tieren dieses Alters scheint das Verhältnis von NGF-Vorstufen zum Endprodukt zugunsten der Vorläufer verschoben zu sein, so daß mit dem relativ unempfindlichen Immunblot im Gewebehomogenat pro-NGF nachgewiesen werden konnte, reifer NGF aber nur mit einem sehr viel empfindlicheren, zweiseitigen Enzymimmuntest gemessen werden kann (Korsching et al. unpubliziert). Deshalb könnte in weiblichen Tieren dieses Alters noch ein zusätzlicher, posttranskriptionaler Regulationsmechanismus existieren. Genauere Untersuchungen mit vorläufer-spezifischen Antikörpern werden nötig sein, um diesen Aspekt in der Ontogenie des Weibchens zu klären. - Zwischen den Geschlechtern der Maus konnte durch sorgfältige Messung ein mRNA^{NGF} Unterschied von Faktor 12 festgestellt werden. Dem steht aber ein fast 80facher Unterschied im spezifischen NGF-Gehalt gegenüber (Heumann et al. 1984). Als Erklärungsmöglichkeit für diese Diskrepanz beim Weibchen käme in Frage: eine schlechtere Translationseffizienz der mRNA, unvollständige Prozessierung des Translationsproduktes und/oder schlechtere Speicherung des Faktors. Auch in diesem Fall kann derzeit noch keine konkrete Aussage gemacht werden. Die NGF-Expression in der Speicheldrüse wird aber nicht

nur durch Testosteron, sondern zusätzlich noch durch L-Thyroxin stimuliert. Nahezu als gesichert darf wohl die Unabhängigkeit beider Regulationsmechanismen voneinander gelten, weil Mäuse mit einer charakterisierten Tfm-Mutation, denen also nachweislich der Testosteronrezeptor fehlt, noch positiv auf L-Thyroxin reagieren können (Aloe und Levi-Montalcini 1980b). Wie man sich die Stimulation der NGF-Expression in beiden Fällen genau vorzustellen hat, beispielsweise welche Sequenzen des NGF Gens beteiligt sind oder ob es eine spezif. Interaktion mit der Kernmatrix gibt etc. ist bisher nicht bekannt.

Die Sequenzierung von Rinder-NGF hat erstmals einen Vergleich der Primärstrukturen von NGF verschiedener Vertebratenspezies ermöglicht und die ausgeprägte Konservierung großer Bereiche des Proteins während der Evolution deutlich gemacht (siehe 6.3.). Jedoch scheinen sich im Laufe der Phylogenie interessante Veränderungen ergeben zu haben, die auf die Prozessierung des Vorläufers und die Assoziation mit anderen Proteinen in exokrinen Drüsen Einfluß haben könnten. Während der HMW NGF-Komplex von Maus bei fast neutralem pH-Wert an DEAE-Zellulose bindet (Varon et al. 1967; Stach et al. 1977), kann dieses Verhalten weder bei Rind, afrikan. Ratte noch bei Meerschweinchen (Rubin et al. 1981) beobachtet werden. Beim Meerschweinchen fehlt die Arginylesteropeptidase Aktivität und bei *Mastomys* kann die γ -Untereinheit als Protein nicht nachgewiesen werden; deshalb läßt sich das Nichtvorhandensein dieser Untereinheit im HMW-Komplex bei allen drei Spezies vermuten. Die cDNA-Sequenz vom Rind kann nun vielleicht für das Fehlen von γ im Komplex eine Erklärung anbieten: das endständige Arginin an Position 118 von bNGF ist zu einem Glutamin mutiert; bei mNGF und vermutlich auch bei bNGF sollte dieser Aminosäureaustausch ausreichen, die Assoziation von β mit γ zu verhindern, weil die Interaktion beider Proteine bei der Maus maßgeblich von dieser basischen Aminosäure abhängt (Moore et al. 1974).

Ziemlich unerwartet erstreckt sich die beobachtete Homologie

des NGF-Gens, die in der proteinkodierenden Sequenz bei den drei bisher untersuchten Vertebraten bei über 80% liegt, bis weit hinein in den 3'nichtkodierenden Teil der mRNA und steigt hier sogar auf 90% an. Diese ausgeprägte Homologie in diesem Genabschnitt wird nur an wenigen Stellen von kleineren Deletionen unterbrochen. Zur Abklärung der Relevanz dieser Beobachtung erschien es ratsam, noch ein anderes Gen der Insulinfamilie auf letztere Eigenschaft hin zu untersuchen. Insulin bot sich insofern an, weil es mit 30% Homologie, NGF entwicklungsgeschichtlich am nächsten steht (Abb. IV-2). Die mRNAs von Ratten- und Hundeinsulin besitzen in der 3'nichtkodierenden Region keine signifikante Homologie, während sich beim Hund und Huhn noch vor dem Polyadenylierungssignal eine Homologie von ungefähr 50%, über eine Strecke von ca. 30 Basen, nachweisen läßt. Auch bei den beiden Teleostei Karpfen und Forelle existiert im besagten Bereich des Insulingens eine Sequenzkonservierung, doch ist sie, wie auch bei den Säugern schwach ausgeprägt. Und eben hierin besteht der wesentliche Unterschied der NGF- und der Insulin-Transkriptionseinheit: in beiden Fällen zeigen die Proteine eine ähnlich hohe Konservierung von ca. 90%, aber nur beim NGF Gen setzt sie sich im gleichen Maß auch in das nichtkodierende 3' Ende der mRNA fort. Das Insulingen zeigt also beim Sequenzvergleich in diesem Bereich eine eklatante Zunahme an Basenfehlpaarungen, was bei den großen phylogenetischen Abständen der Spezies zueinander auch nicht weiter verwundert, solange diesen Sequenzen keine wesentlichen Funktionen bei der Regulation oder in Hinblick auf die Kompartimentierung in der Zelle zukommen. Der Grund für die Ausweitung des Selektionsdruckes auf das 3'nichtkodierende Ende der mRNA^{NGF} ist derzeit noch nicht geklärt, aber offensichtlich nicht selbstverständlich wie das Beispiel Insulin zeigt.

Die Sequenzierung von Rinder NGF ist in erster Linie vorgenommen worden, um durch den Vergleich mehrerer verfügbarer Primärstrukturen, Gemeinsamkeiten der Proteinsequenz herauszuarbeiten. (siehe 6.3.) und um Rückschlüsse auf die Lage des

konservierten aktiven Zentrums anzustellen. Unter anderem kam es auch darauf an, als eine Voraussetzung für spätere in vitro Mutagenese-Studien, die Bedeutung der Cysteine, Tryptophane und der Histidine für die biologische Aktivität von NGF wahrscheinlich zu machen, durch die Erbringung des Nachweises, daß diese Reste im Protein streng konservierte Positionen während der Phylogenie innehaben (siehe 6.3.). Die Modifikation von NGF, sei sie chemisch oder durch in vitro Mutagenese induziert, kann die biologische Aktivität des Faktors beeinflussen entweder durch Veränderung der Affinität von NGF zum Rezeptor oder durch Beeinträchtigung der Fähigkeit des NGF/Rezeptor-Komplexes, die biologische Antwort auszulösen. Beide denkbaren Effekte sollten durch eine Änderung der Aminosäurereste an der Rezeptorbindungsstelle, aber auch durch Änderung der Ladungsverteilung auf der Moleküloberfläche (Pullen et al. 1976) oder durch Konformationsänderung des Wachstumsfaktors zustande kommen können. So läßt sich beispielsweise vermuten, daß ein Aminosäureaustausch der Cysteine an Position 108 und 110 gegen Alanin die biologische Aktivität zwar teilweise bis vollständig zerstört, aber deshalb noch lange nicht die Rezeptorbindungsstelle lokalisiert ist, also jene Reste, die direkt mit dem Rezeptorprotein über Wasserstoffbrücken oder hydrophobe Wechselwirkung etc. interagieren. Sollte es einmal durch Mutagenese und/ oder chemische Modifikation gelingen, bestimmte Reste einem tentativen aktiven Zentrum zuzuordnen, so muß zusätzlich die weitgehende Bewahrung der räumlichen Struktur des modifizierten Proteins demonstriert werden, um Konformationsänderungen größeren Stils als primäre Ursache für das Ausbleiben der biologischen Aktivität ausschließen zu können.

Die chemische Modifikation der Histidine im 2,5S NGF durch Diäthylpyrokarbonat bewirkt gemäß Fluoreszenzspektroskopie keine Konformationsänderung von NGF, senkt aber seine Affinität zum Rezeptor um wenigstens eine Größenordnung (Dunbar et al. 1984). Hierbei sollte besonders das Histidin-75 von Bedeutung sein, weil His-84 bei Kobra NGF ausgetauscht

worden ist und die beiden anderen näher am aminoterminalen Ende gelegenen Histidine sowieso ohne Einfluß auf die biologische Aktivität sind (siehe 6.3. und Abb. IV-3). Sinnvoll erscheint die postulierte Beteiligung von His-75 am aktiven Zentrum durch seine unmittelbare Nachbarschaft zum Trp-76, eines von jenen drei Tryptophanen, die maßgeblich an der biologischen Aktivität von NGF beteiligt sein sollen (Frazier et al. 1973). Doch wurde für die Oxidation der Tryptophane N-Bromosuccinimid verwendet, das zusätzlich auch Peptidbindungen zu spalten vermag. Cohen und Mitarbeiter (1980) berichten von solchen Nebenreaktionen während der Modifikation der Tryptophane im NGF. Doch soll das Ausmaß der Peptidspaltungen nicht ausreichen, den beobachteten Verlust an biologischer Aktivität zu erklären. Endgültig beilegen läßt sich die Diskussion um die Bedeutung der Tryptophane für NGF erst, wenn in vitro Mutagenese-Experimente und Konformationsstudien des mutierten Faktors vorliegen.

Die Suche nach der Rezeptorbindungsstelle von NGF ist ganz erheblich erschwert durch die noch immer nicht erstellte 3D-Struktur mittels Röntgenstrukturanalyse. Die Homologie zwischen NGF und Insulin, dessen 3D-Struktur bekannt ist (Pullen et al. 1976), beträgt bei bestmöglicher Anpassung der B und A Kette an die Primärstruktur von NGF immerhin 30% und ist damit wesentlich ausgeprägter als mit jedem anderen Mitglied der Insulinfamilie (Abb. IV-2). Auffallend ist nun, daß Trp-21, das reaktivste der Tryptophane (Frazier et al. 1973) und wahrscheinlich für das Lösungsmittel das zugänglichste, mit potentiellen Resten der Rezeptorbindungsstelle der B-Kette von Insulin (Pullen et al. 1976) zusammenfällt (Abb. IV-2). Dabei erfüllen selbstverständlich diese Aminosäuren des Insulins in der Phylogenie die notwendige Voraussetzung einer hohen Konservierung. Zwei weitere Kandidaten für das aktive Zentrum von NGF His-75 und Trp-76 liegen den Resten A19 und A21 der A-Kette entsprechend nahe, von denen eine Lage an der Peripherie der Bindungsstelle von Insulin erwartet wird. Ob die beiden entfernt verwandten Proteine Insulin und NGF, deren aktive Zentren nicht um die

B-Kette

A-Kette

More MGT

Hoch. MGP

Mech. Insul

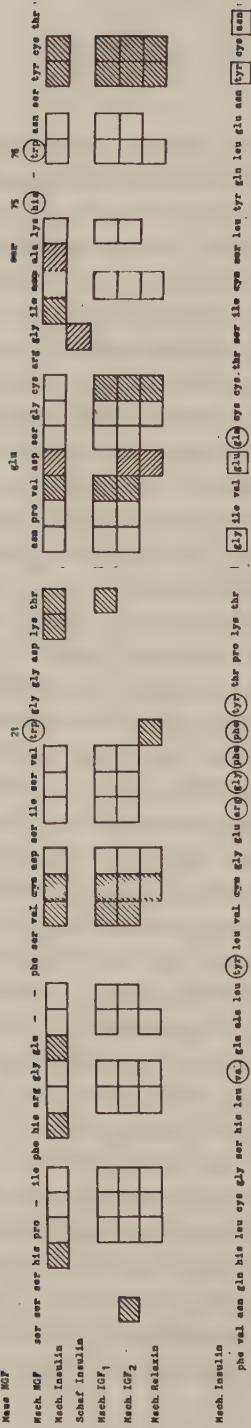
Schaf Insulin

Mach IGF₁

Mech. IGY.

Mech. Relaxin

Mech. Insulin



gleiche Bindungsstelle kompetieren (Herrup et al. 1973), die Position der Rezeptorbindungsstelle im Protein im Laufe ihrer divergenten, phylogenetischen Entwicklung beibehalten haben, und nur die am aktiven Zentrum beteiligten Reste ausgetauscht wurden bzw. das aktive Zentrum geringfügig longitudinal verschoben wurde, bei gleichzeitig drastischen Veränderungen des restlichen Proteins (Kettenlänge, Prozessierung, Disulfidbrückenpaarungen etc.), kann derzeit nicht beantwortet werden. Ganz abwegig erscheint diese Vorstellung aber angesichts der Evolution innerhalb der Serinproteasenfamilie nicht, auch wenn die Mitglieder einander funktionell näher stehen und Übergänge zwischen den Familienmitgliedern vorhanden sind: um ein konserviertes, aktives Zentrum herum konnte eine Fortentwicklung von einem völlig unspezifischen Verdauungsenzym wie Trypsin in Richtung auf äußerst spezifische Proteasen wie z.B. Renin einsetzen, wobei die Homologie zwischen Trypsin (Ratte) und einem beliebigen Kallikrein, Ratten Pankreas-Kallikrein sei einmal herausgegriffen, auch nur mehr ca. 35% beträgt.

Die Peptidschleife von Cys-58 bis Cys-68 hat bei den hier untersuchten Vertebraten mehrmals einen Aminosäureaustausch erfahren. So tritt an Position 61 bei Mensch und Rind ein zweites helixbrechendes Prolin und bei Kobra wird, basierend

Abb. IV-2: Vergleich der Aminosäuresequenz einiger Hormone und Wachstumsfaktoren der Insulinfamilie

Vergleicht man NGF mit der B und A Kette von Insulin und nicht mit pro-Insulin, so steigt die nachweisbare Homologie auf 30%. Identität innerhalb der Sequenz von menschlichem NGF mit den Familienmitgliedern wird durch schraffierte Quadrate (links unten nach rechts oben) gekennzeichnet. Ausgefüllte Quadrate mit entgegengesetzter Orientierung zeigen zusätzliche Identitäten von Maus NGF mit besagten Proteinen an. Weiße Quadrate stehen für identische Reste exklusiv NGF. Horizontale Striche stehen für artifizielle Deletionen um maximale Anpassung zu erzielen.

Potentielle Aminosäurereste der Rezeptorbindungsstelle von Insulin und NGF sind kreisförmig umrandet. Eckig umrandet sind Reste, die an der Peripherie des aktiven Zentrums von Insulin vermutet werden. Die ähnliche Topologie der mutmaßlichen Rezeptorbindungsstellen von Insulin und NGF werden im Text diskutiert.

auf der Aminosäureanalyse, sogar ein drittes Prolin in dieser Region vermutet. Wegen der noch zusätzlichen Tolerierung einer Asparaginsäure an Stelle eines Alanins bei Mensch Rind und Kobra, dürfte diese Schleife zwischen den Cysteinen wohl kaum etwas zum konservativen Zentrum von NGF beitragen, sondern lediglich die Verbindung zwischen den beiden wichtigen Cysteinen herstellen (Abb. IV-3).

Nach der Etablierung eines Expressionssystems, evtl. in Hefe, weil ihr Sekretionsweg höheren Eukaryonten näherkommt und Proteasen gegen dibasische Prozessierungsstellen in Prohormonen besitzt (Mizuno et al.1984), könnte gentechnologisch relativ einfach ein erster Schritt zur Eingrenzung des aktiven Zentrums von NGF vorgenommen werden. An Position 50 (Proteinniveau) der β -Untereinheit schneidet das Restriktionsenzym Sca I jeweils die kodierende cDNA von Rind und Maus (persönliche Mitteilung R.Götz). Rekombiniert man in vitro das Restriktionsfragment, kodierend für den Amino-terminus von Rinder NGF, mit dem ergänzenden DNA-Stück von Mäuse NGF, so hat man ein Fusions-Genprodukt mit einem zusätzlich zweiten Methionin an Position 37 geschaffen (Abb. IV-3). Durch Cyanbromid-Behandlung dieses exprimierten NGFs ließe sich dann untersuchen, inwieweit die Abspaltung eines solchen wesentlich längeren Peptids am Aminotermius, im Vergleich zum Nonapeptid, die biologische Aktivität bzw. die Affinität zu Neuronenmembranen beeinflusst. In einem nächsten Schritt, falls dies erforderlich sein sollte, kann das Cystein-15 durch Mutagenese in Alanin umgewandelt werden, um die vollständige Abtrennung des Peptids vom restlichen Protein problemlos zu ermöglichen. Ein vorzeitiger Translationsstopp am entgegengesetzten Ende, direkt vor oder zwischen den Cysteinen, wäre eine logische Fortsetzung des gleichen Gedankengangs. Der große Vorteil dieser Manipulation mit Cyanbromid besteht darin, daß bis zur Spaltung die native Konformation des Proteins unbeeinflusst bleibt. Die am Amino- und Carboxyterminus einföhrbaren Verkürzungen der Polypeptidkette könnten erste Hinweise erbringen, ob die

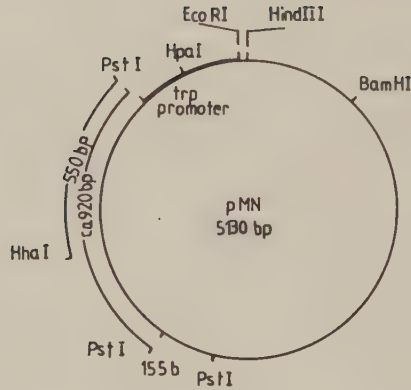
V. ZUSAMMENFASSUNG

Der Nervenwachstumsfaktor (NGF) ist bisher der einzige gut charakterisierte neurotrophe Faktor. Seine Wirkung ist im peripheren Nervensystem auf sympathische und sensorische Neurone beschränkt. Neuronales Zielgewebe sezerniert NGF in die interstitielle Flüssigkeit, und dieser wird über spezifische Rezeptoren retrograd zum Soma des Neurons transportiert. NGF ist somit ein sekretorisches Protein, das aus bisher unbekannten Gründen besonders stark in der Speicheldrüse der männlichen Maus exprimiert und dort in großen Vesikeln tubulärer Zellen gespeichert wird. Da in histochemischen Schnitten nur Vesikel nahe der cytoplasmatischen Membran mit Antiserum gegen NGF kreuzreagieren und nicht z.B. das Golgifeld, wurden für NGF Vorläufer vermutet, die nicht von Antikörpern gegen das native Endprodukt erkannt werden. Durch die Erstellung von Antisera gegen denaturierten NGF gelang es, diese Vorstufen einschließlich des primären Translationsprodukts (34kD) im Speicheldrüsengewebe mit dem Immunblot erstmals nachzuweisen. Die Übereinstimmung der Peptidkarten vom kleinsten 18kD Vorläufer und von NGF demonstrierte die Spezifität der erstellten Antisera. Weiterhin gelang es in einem alternativen Ansatz durch Hybridselektion, NGF-spezifische mRNA aus der Speicheldrüse der Maus anzureichern und ihr zugehöriges Genprodukt, durch in vitro Translation in einem Kaninchen-Retikulozytenlysat, ebenfalls auf 34kD festzulegen.

Maus NGF und Rinder NGF zeigen bei allen durchgeführten biologischen Tests gleiche biologische Aktivität, weisen jedoch andererseits immunologische Unterschiede auf. Diese Beobachtung ließ vermuten, daß das biologisch aktive Zentrum des Faktors während der Evolution stark konserviert wurde. Dieser Vorstellung wurde durch Klonierung und Sequenzierung von Rinder NGF nachgegangen, wobei als experimenteller Ansatz eine cDNA-Bank aus der Glandula vesiculosa, einer ak-

zessorischen Geschlechtsdrüse des Stieres, erstellt wurde. Durch chemische und M13 Didesoxy-Sequenzierung konnte schließlich die Primärstruktur des Faktors bestimmt und ein Sequenzvergleich von Maus, Mensch, Rind und mit Vorbehalt von Kobra durchgeführt werden. Der bovine NGF zeigt gegenüber Maus die hohe Homologie von 85%; ein Wechsel der Aminosäureklasse an etwa 10 Positionen im Protein reicht bereits aus, die antigenen Determinanten dieses Moleküls gegenüber Maus so zu verändern, daß eine gegenseitige Immunpräzipitation nicht mehr möglich ist. Die hohe Konservierung der NGF Sequenz bei den Mammaliern erschwert Rückschlüsse auf das aktive Zentrum des Moleküls. Die Analyse der verfügbaren Primärstrukturen macht jedoch die strenge Konservierung von 6 Cysteinen an festen Positionen der Polypeptidkette deutlich und läßt eine identische Disulfidbrückenkonfiguration über die Familie der Säuger hinaus erwarten. Funktionell scheinen wenigstens 2 dieser 3 Brücken an der nativen Konformation der Rezeptorbindungsstelle beteiligt zu sein, wobei das Augenmerk besonders auf die Cystine Cys-58/Cys-108 und Cys-68/Cys-110 gerichtet werden sollte. Auch die Tryptophane 21, 76 und 99 sowie das Histidin-76 sind in allen Spezies, einschließlich Kobra, konserviert worden und könnten, durch die native Faltung des Proteins und deren Stabilisierung durch kovalente Brücken, in räumliche Beziehung zueinander treten. Auf Grund der gewonnenen Erkenntnisse werden Vorschläge zur Identifizierung wichtiger Aminosäuren des aktiven Zentrums durch in vitro Mutagenese gemacht.

ANHANG



A-1: Plasmid mit cDNA^{NGF}-Insert (J. Scott 1983).

Dieser Vektor leitet sich von pBR322 ab, dessen Eco RI/Pst I Fragment durch ein 400bp langes Fragment aus der Tryptophan Promoterregion von E.coli ersetzt worden ist. In die singuläre Pst I Stelle wurde cDNA über G/C "Tailing" inseriert.

mNGF	5'	GCC TGT GTG TGT GTG CTC	3'
bNGF		C	
oligo NGF 1	3'	CGG ACA CAC ACA CAC GAG	5'

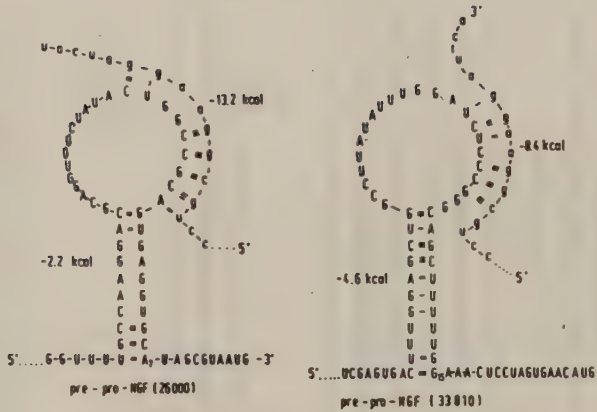
A-2: Sequenz des Oligodesoxynukleotids NGF1.

Gemäß der bekannten mRNA Sequenz wurde das komplementäre Oligonukleotid automatisch mit dem Phosphit-Amidit-Verfahren synthetisiert.

Pre-Penicillinase	MetSerIleGlnHisPheArgValAlaLeuIleProPheMetAlaIaPheCysLeuProValPheAla His
Pre-Lipoprotein (E.coli)	MetLysAlaThrLysLeuValLeuGlyAlaValIleLeuGlySerThrLeuLeuAlaCly Cys
Pre-Vesicular Stomatitis Virus glycoprotein	MetLysCysLeuLeuGlyTrpLeuAlaPheLeuPheIleHisValAsnCys Lys
Pre-pro-Albumin	MetLysTrpValThrPheLeuLeuLeuLeuPheLeuSerGlySerAlaPheSer Arg
Pre-IgG light chain	MetAspMetArgAlaProIleGlnIlePheGlyPheLeuLeuLeuLeuPheTrpClyThrArgCys Asp
Pre-Lysozyme	MetArgSerLeuLeuIleLeuValLeuCysPheLeuProLeuAlaIleLeuGly Lys
Pre-Prolactin	MethanSerGluValSerAlaArgLysAlaClyThrLeuLeuLeuLeuMetSerLeuLeuLeuPheCysGlnAsnValClnThr Leu
Pre-pro-Insulin	MetAlaIleuTrpMetArgPheLeuProLeuLeuAlaLeuValLeuTrpGluProLysProAlaGlnAla Phe Val
Leucocyte Interferon	MetAlaIleuThrPheAlaLeuLeuValAlaLeuLeuValLysSerCysLysSerSerCysSerValCly Cys Asp Leu
prediction of cleavage sites:	
Preprokallikrein	MetProValThrMetTrpPheLeuLeuLeuPheLeuAlaLeuSerLeuGlyArgAsnAspAla Ala Pro Pro
Pre-pro-NGF (32800)	MethenCysLeuLysProValLysLeuValGlyHisGlyGlnHisGlyGlyValIleuAla Cys Gly Arg Ala
Pre-pro-NGF (25900)	MetSerPheLeuPheTyThrLeuIleThrAlaPheLeuIleGlyValGlnAlaGluProTrpThrAspSer Asn Val Pro

A-3: Eine Auswahl bekannter Signalsequenzen.

Aspartbare Signalpeptide sekretorischer Proteine besitzen im allgemeinen einen zentralen Bereich hydrophober Aminosäuren. Die Prozessierung erfolgt meistens direkt hinter einer kleinen Aminosäure außerhalb dieses Bereiches. Das Prolin nahe der Spaltstelle gelegen sein kann. Der Aminoterminus von pre-pro-NGF (32800) weist nicht diesen ausgeprägten, hydrophoben Bereich auf, und somit ist seine Funktion für die Sekretion nicht eindeutig.

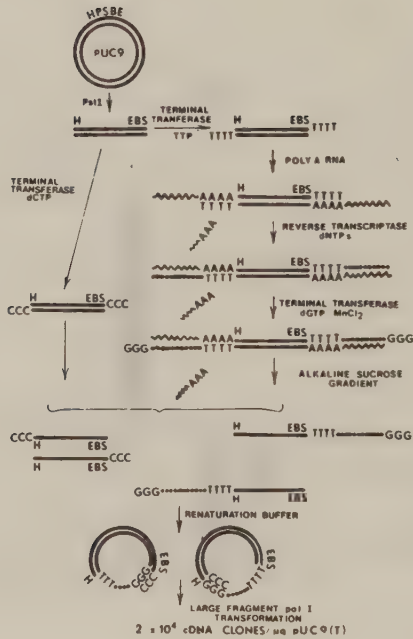


A-4: Potentielle Ribosomenbindungsstelle in einer Haarnadel-
schleife ähnlicher Stabilität vor den Methioninen 1 und
67 der mRNA von Maus prä-pro-NGF.

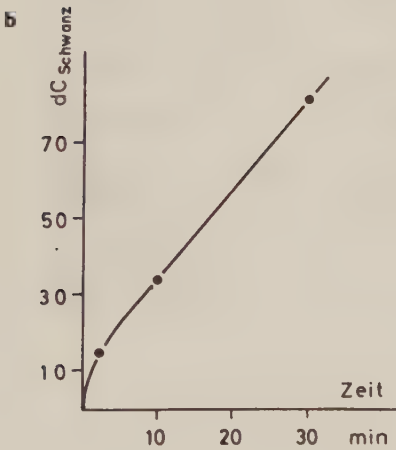
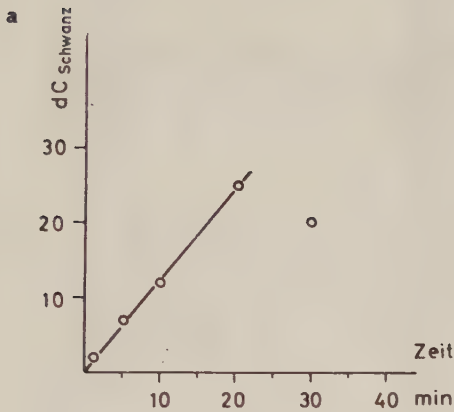


A-5: Präparation membrangebundener RNA aus *Glandula vesiculosa*.

Die membrangebundenen Polysomen wurden mittels eines Saccharose-Stufengradienten in Gegenwart von Vanadylribonukleosidkomplexen präpariert. Im Agarose-Harnstoff-Gel (Spur 1 und 2) erwies sich diese so gewonnene RNA als degradiert; vergleiche hierzu die gesamtzelluläre RNA (3), extrahiert nach Chirgwin mit Guanidiniumthiocyanat.

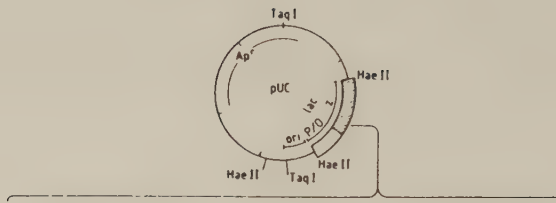


A-6: Vektorinduzierte Klonierungsstrategie nach Heidecker/Messing.



A-7: Addition von dCs an pUC9 mit terminaler Transferase.

Die überstehenden 3'Enden von Pst I restringiertem pUC9 wurden, nach der Vorschrift von Michelson et al. (1982), bei 12 (a) und 20°C (b) mit dCs verlängert. Die Zahl angehängter Nukleotide wurde durch TCA-Fällung des eingebauten Tritiums abgeschätzt (siehe Methoden Pkt.29).



1 2 3 4 1 2 3 4 5 4 7 8 9 10 11 5 4 7 8
 thr met de thr pro ser leu ala ala gly arg arg ile pro gly asn ser leu ala
 pUC 9 ATG ACC ATG ATT ACG GCA AGC TTG GCT GCA GGT CGA CGG ATC CCC GGG AAT TCA CTG GCC
 HindIII PstI SalI BamHI SmaI EcoRI HaeIII
 AccI HndII XmaI

Möglichkeiten für kohäsive Insertion.

pUC9/ M13 mp9

klonierbares Fragment

Bam HI	G [↓] GATC C	GGATCC	Bam HI	G [↓] GATC G
			Bgl II	A GATC T
			Bcl I	T GATC A
			Sau 3A	
			Mbo I	N GATC N

Eco RI	G [↓] AATT C	GAATTC	Eco RI	G AATT C
			Eco RI*	N AATT N

Pst I	C TGCA [↓] G	CTGCAG	Pst I	C TGCA G
-------	-----------------------	--------	-------	----------

G-"tailing" jedes Fragment

1) Sal I	G [↓] TCGA C	GTCGAC	Sal I	G [↓] TCGA C
			Xho I	C TCGA G
2) Acc I	GT [↓] CG AC		Acc I	GT [↓] CG AC
			Cla I	AT CG AT
			Hpa II	NC CG GN
			Taq I	NT CG AN
			Hin P1	NG CG CN

A-8: Aufbau der pUC Plasmide und spezielle Klonierungsmöglichkeiten in pUC9 bzw. M13 mp9.

Die pUC-Plasmide leiten sich von einem 2297bp langen PvuII/ Eco RI Fragment aus pBR322 ab, das nur den Ursprungspunkt der Replikation und den genetischen Marker Ap^r trägt. An der Hae II Stelle nahe ori tragen die pUC-Plasmide ein ca.400bp langes Fragment mit den lac-Kontrollelementen sowie mit der kodierenden Region für ersten 141 Aminosäuren von lacZ. Innerhalb dieser Region befindet sich ein Polylinker mit multiplen, singulären Schnittstellen für Restriktionsnukleasen (Vieira und Messing, 1982).



A-9: Variation der Mg^{++} -Konzentration im "Annealing" Ansatz der Didesoxysequenzierung.

a) Die Mg^{++} -Konzentration wurde von den üblichen 10mM auf 2mM reduziert. Bei den gewählten Bedingungen (siehe Methoden) ist bei 2mM Mg^{++} , keine Extension des Primers mehr zu beobachten.

b) Sequenz von M13 mp10/1 bei Verwendung des spezifischen Primers oligo NGF1.

99
?AG GCG CTG ACC ATG GAC GGC AAG CAG GCC GCC TGG CGG TTC ?
A
ATC CGG ATC GAC ACG GCC TGC GTG TGT GTG CTC AGC AGG AAG
 cys cys
ACT G ala op
 GGC TGA CCT GCC GA

A-10: Sequenz von pBN 10, erhalten durch Didesoxysequenzierung von M13 mp10/1 und M13 mp10/3

```

                                     -187                                     -180
                                     met leu cys leu lys pro val lys
m  accgcacacagctgactcttggagctgacattatattggatctcccgggcagctttttggaaactcctagtgmacc ATG CTG TCC CTC AAG CCA GTG AAA

                                     -170                                     -160
leu gly ser leu glu val gly his gly gln his gly gly val leu ala cys gly arg ala val gln gly ala gly trp
m  TTA CGC TCC CTG GAG CTG GGA CAC GGG CAG CAT GGT CGA GTT TTG GCC TGT GGT CGT GCA GTG CAG GGG CCT CGA TGG

h
b
                                     ala
                                     CC
                                     trp
                                     T G
                                     C
                                     G
                                     G
                                     pro
                                     C
                                     G

                                     -150                                     -140                                     -130
his ala gly pro lys leu thr ser val ser gly pro asn lys gly phe ala lys asp ala ala phe tyr thr gly arg ser
m  CAT GCT CGA CCC AAG CTC ACC TCA GTG TCT CGG CCC AAT AAA GGT TTT GCC AAG CAC GCA CCT TTC TAT ACT CGC CGC AGT

h
b
                                     ser
                                     G
                                     ala
                                     C
                                     C
                                     A
                                     asn
                                     C
                                     A
                                     thr
                                     A
                                     gly
                                     GA
                                     pro
                                     C
                                     his
                                     thr
                                     A
                                     C
                                     A
                                     C

                                     -120                                     -110                                     -100
glu val his ser val met ser met leu phe tyr thr leu ile thr ala phe leu ile gly val gln ala glu pro tyr thr
m  GAG GTG CAT AGC GTA ATC TCC ATC TTG TTC TAC ACT CTG ATC ACT CGG TTT TTG ATC GGC GTA CAG GCA GAA CGG TAC ACA

h
b
                                     phe
                                     T
                                     A
                                     T
                                     C
                                     ile
                                     A
                                     G
                                     his
                                     ser
                                     A
                                     C
                                     T

                                     -90                                     -80
asp ser asn val pro glu gly asp ser val pro glu ala his trp thr lys leu gln his ser leu asp thr ala leu arg
m  CAT ACC AAT GTC CCA GAA GGA CAC TCT GTC CCT GAA CCC CAC TGG ACT AAA CTT CAG CAT TCC CTT GAC ACA CCC CTC CGC

h
b
                                     glu
                                     G
                                     ala
                                     T
                                     C
                                     his
                                     C
                                     thr
                                     A
                                     C
                                     A
                                     gln
                                     C
                                     val
                                     C
                                     T
                                     T
                                     T
                                     T

                                     -70                                     -60                                     -50
arg ala arg ser ala pro thr ala pro ile ala ala arg val thr gly gln thr arg asn ile thr val asp pro arg leu
m  ACA CCC CGC ACT GGC CCT ACT GCA CCA ATA GCT CCC CGA GTG ACA CGG CAG ACC CGC AAC ATC ACT GTA GAC CCC AGA CTC

h
b
                                     ala
                                     C
                                     G
                                     G
                                     A
                                     G
                                     G
                                     G
                                     A
                                     C
                                     G
                                     G
                                     T
                                     G
                                     G

                                     -40                                     -30                                     -20
phe lys lys arg arg leu his ser pro arg val leu phe ser thr gln pro pro thr ser ser asp thr leu asp leu
m  TTT AAG AAA CCG AGA CTC CAC TCA CCC CGT GTC CTG TTC AGC ACC CAG CCT CCA CCC ACC TCT TCA GAC ACT CTG GAT CTA

h
b
                                     arg
                                     GT
                                     T
                                     arg
                                     glu
                                     ala
                                     ala
                                     C
                                     GT
                                     GAA
                                     G
                                     G
                                     gln
                                     A
                                     G

                                     -10
asp phe gln ala his gly thr ile pro phe asn arg thr his arg ser lys arg ser ser thr his pro val phe his met
m  CAC TTC CAG GCC CAT GGT ACA ATC CCT TTC AAC AGG ACT CAC CGG AGC AAG CGC TCA TCC ACC CAC CCA GTC TTC CAC ATG

h
b
                                     glu
                                     val
                                     gly
                                     C
                                     T
                                     GG
                                     ala
                                     ala
                                     G
                                     T
                                     CC
                                     C
                                     A
                                     G
                                     G
                                     A
                                     T
                                     C
                                     A
                                     T
                                     C
                                     T
                                     arg
                                     G
                                     CG

```

A-11: Gegenüberstellung der prä-pro-Sequenzen der NGF mRNA von Maus (Scott, 1983), Mensch (Ullrich, 1983) und Rind, soweit dies derzeit möglich ist.

LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, J.C.: Heavy metal intensification of DAB-based HRP reaction products.
J. Histochem. Cytochem. 29, 775 (1981)
- Aloe, L., Cozzari, C., Levi-Montalcini, R.: The submaxillary salivary glands of the African rodent *Mastomys natalensis* as the richest available source of the nerve growth factor.
Exp. Cell Res. 133, 475-479 (1981)
- Aloe, L., Levi-Montalcini, R.: Comparative studies on testosterone and L-thyroxine effects on the synthesis of nerve growth factor in mouse submaxillary salivary glands.
Exp. Cell Res. 125, 15-22 (1980)a
- Aloe, L., Levi-Montalcini, R.: Enhanced differentiation of sexually dimorphic organs in L-thyroxine treated Tfm mice.
Cell Tissue Res. 205 19-29 (1980)b
- Amara, S.G.; Jonas, V., Rosenfeld, M.G., Ong, E.S., Evans, R.M.: Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products.
Nature 298, 240-244 (1982)
- Anderson, A.T.:
Rev. Geophys. Space Phys. 13, 37-55 (1973)
- Appleyard, R.K.: Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K 12.
Genetics 39 440-452 (1954)
- Arnon, R., Maron, E., Sela, M., Anfinsen, C.B.: Antibodies reactive with native lysozyme elicited by a completely synthetic antigen
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 1450-1455 (1971)
- Aviv, H., Leder, P.: Purification of biologically active globin mRNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1408 (1972)
- Barde, Y.-Å., Edgar, D., Thoenen, H.: New neurotrophic factors
Ann. Rev. Physiol. 45, 601-612 (1983)
- Barde, Y.-Å., Edgar, D. und Thoenen, H.: Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain.
EMBO J. 1, 549-553 (1982)
- Berge-LeFranc, J.L., Cartouzon, G., Maltieri, Y., Perrin, F., Jarry, B., Lissitzky, S.: Cloning of four DNA fragments complementary to human thyroglobulin mRNA.
Eur. J. Biochem. 120, 1-7 (1981)

- Berger, S.L., Birkenmeier, C.S. Inhibition of intractable nucleases with ribonucleoside-vanadyl complexes: isolation of messenger ribonucleic acids from resting lymphocytes.
Biochemistry 18, 5143-5149 (1979)
- Berger, E., Shooter, E.M.: Evidence for pro- β -nerve-growth-factor, a biosynthetic precursor to β -nerve growth factor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3647-3651 (1977)
- Berger, E.A., Shooter, E.M.: The biosynthesis of β -nerve growth factor in mouse submaxillary gland.
J. Biol. Chem. 253, 804-810 (1978)
- Biggin, M.D., Gibson, T.J., Hong, G.F.: Buffer gradient gels and ³⁵S label as an aid to rapid DNA sequence determination.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3963-3965 (1983)
- Birnboim, H.C.: A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA.
Methods of Enzymology 100, 243-255 (1983)
- Blin, N., Stafford, D.W.: Isolation of high-molecular-weight DNA.
Nucleic Acids Res. 3, 2303 (1976)
- Bocchini, V., Angeletti, P.U.: The nerve growth factor: purification as a 30.000-molecular-weight protein
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 64, 787-792 (1969)
- Bode, W.: Aktivierung, Aktivität und Inhibierung des Rindertrypsins
Naturwissenschaften 66, 251-258 (1983)
- Bolivar, F., Rodriuez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heydeker, H.L., Boyer, H.W.: Construction and characterization of new cloning vectors II. A multipurpose cloning system.
Gene 2, 95-113 (1977)
- Borenfreund et al.: Isolation and properties of deoxyribonucleic acid from mammalian sperm.
Nature 191, 1375-1377 (1961)
- Bothwell, M.A., Shooter, E.M.: Thermodynamics of the interaction of the subunits of 7S nerve growth factor
J. Biol. Chem. 253, 8458
- Bothwell, M., Wilson, W.H. and Shooter, E.M.: The relationship between glandular kallikrein and growth factor processing proteases of the mouse submaxillary gland.
J. Biol. Chem. 254, 7287-7294 (1979)
- Boyer, H.W. and Roulland-Dussoix, D.: A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in Escherichia coli.
J. Mol. Biol. 41, 459-472 (1969)

- Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. 72, 248-254 (1976)
- Bradshaw, R.A.: Nerve growth factor
Ann. Rev. Biochem. 47, 191-216 (1978)
- Brutlag, D., Fry, K., Nelson, T., Hung, P.: Synthesis of hybrid bacterial plasmids containing highly repeated satellite DNA.
Cell 10, 509-519 (1977)
- Buecker, E.D.
Anat. Rec. 102, 369 (1948)
- Buell, G.N., Wickens, M.P., Payvar, F., Schimke, R.T.: Synthesis of full length cDNAs from four partially purified oviduct mRNAs.
J. Biol. Chem. 253, 2471-2482 (1978)
- Calissano, P., Antonio, C. Aloe L., Levi-Montalcini, R.: The nerve growth factor
in: Hormonal proteins and peptides XII (Choh Hao Li ed.) Academic Press (1984)
- Caramia, F., Angeletti, P.U., Levi-Montalcini, R.: Experimental analysis of the mouse submaxillary salivary gland in relationship to its nerve growth factor content.
Endocrinology 70, 915-922 (1962)
- Carlsson, J., Drevin, H., Axen, R.: Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate a new heterobifunctional reagent.
Biochem. J. 173, 723-737, (1978)
- Cathala, G., Savouret, J.F., Mendez, B., West, B.L., Karin, M., Martial, J.A., Baxter, J.D.: A method for isolation of intact, translationally active ribonucleic acid.
DNA 2, 329-335 (1983)
- Chapman, C.A.; Buaks, B.E.C., Vernon, C.A., Walker, J.M.: The isolation and characterisation of nerve growth factor from the prostate gland of the guinea-pig.
Eur. J. Biochem. 115, 347-351 (1981)
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., Mac Donald, R.J., Rutter, W.J.: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease.
Biochemistry 18, 5294-5299 (1979)
- Chou, P.Y. und Fasman, G.: Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence.
Adv. Enzymol. 47, 45-148 (1978)

- Cirelli, O., Birnberg, N., Herbert, E.: Detection and quantitation of pro-opiomelanocortin mRNA in pituitary and brain tissues from different species.
J. Biol. Chem. 257, 6783-6787 (1982)
- Clemens, M.J.: Translation of eukaryotic messenger RNA in cell-free extracts.
in: Transcription and translation (Hames, B.D., Higgins, S.J. eds.) 231-270 (1984)
- Cohen, S.: Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neurocytotoxic antiserum
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 46, 302-311 (1960)
- Cohen, S.:
in: The chemical basis of development (Mc Elroy, W.D., Glass B.eds.) John Hopkins Press Baltimore, Maryland 665-679 (1958)
- Cohen, P., Sutter, A., Landreth, G., Zimmermann, A., Shooter, E.M.: Oxidation of tryptophan-21 alters the biological activity and receptor binding characteristics of mouse nerve growth factor.
J. Biol. Chem. 255, 2949-2954 (1980)
- Crestfield, A.M., Stein, W.H., Moore, S.: Alkylation and identification of the histidine residues at the active site of ribonuclease.
J. Biol. Chem. 238, 2413-2421 (1963)
- Dagert, M. and Ehrlich, S.D.: Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells.
Gene 6, 23-28 (1979)
- Darling, T.L., Petrides, P.E., Beguin, P., Frey, P., Shooter, E.M., Selby, M., Rutter, W.J.: The biosynthesis and processing of proteins in the mouse 7S nerve growth factor complex.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 48, 427-433 (1983)
- Degani, Neumann, Y.H., Patchornik, A.: Selective cyanylation of sulphydryl groups.
J. Am. Chem. Soc. 92, 6969
- Dente, L., Cesareni, G. & Cortese, R.
Nucleic Acids Res. 11, 1645 (1983)
- Dente, L., Sollazzo, M., Baldari, C., Cesareni, G., Cortese, R.: The pEMBL family of single-stranded vectors.
in: DNA cloning vol.I (Glover, D.M. ed) IRL press (1985)
- Deppert, W., Walter, G.: Domains of Simian virus 40 large T-antigen exposed on the cell surface.
Virology 122, 56-70 (1982)

- Di Segni, G., Rosen, H., Kaempfer, R.: Competition between α - and β -Globin messenger ribonucleic acids for eucaryotic initiation factor 2.
Biochem. 18, 2847-2854 (1979)
- Dicou, E. und Brachet P.: Precursors of the nerve growth factor γ -subunit and renin bind to microtubules.
Europ. J. Biochem. 143, 381-387 (1984)
- Doolittle, R.F., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E., Devare, S.G., Robbins, K.C., Aaronson, S. and Antoniades, H. N.: Simian sarcoma virus onc gene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet derived growth factor.
Science 221, 275-277 (1983)
- Douglass, J., Civelli, O., Herbert, E.: Polyprotein gene expression: generation of diversity of neuroendocrine peptides.
Ann. Rev. Biochem. 53, 665-715 (1984)
- Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrace, G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, J. and Waterfield, M.D.: Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences
Nature 307, 521-527 (1984)
- Duguid, J., Steiner, D. and Chick, W.: Partial purification and characterization of the mRNA for rat preproinsulin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3539-3543 (1976)
- Dunar, J.C., Tregear, W., Bradshaw, R.H.: Histidin residue modification inhibits binding of murine β nerve growth factor to its receptor.
J. Protein Chem. 3, 349-356 (1984)
- Efstratiadis, A., Kafatos, F.C., Maxam, A.M., Maniatis, T.: Enzymatic in vitro synthesis of globin genes.
Cell 7, 279 (1976)
- Ehrlich, H.A., Levinson, J.R., Cohen, S.N., Mc Devitt, H.O.: Filter affinity transfer.
J. Biol. Chem. 254, 12240-12247 (1979)
- Elder, J.H., Pickett, R.A., Hampton, J. and Lerner, R.A.: Radioiodination of proteins in single polyacrylamide gel slices.
J. Biol. Chem. 252, 6510 (1977)
- Evans, B.A. and Richards, R.I.: Genes for the α - and γ -subunits of mouse nerve growth factor are contiguous.
EMBO J. 4, 133-138 (1985)
- Fahnestock, M., Darling, T. and Shooter E.: The high molecular weight nerve growth factor complex from *Mastomys natalensis* contains only two types of subunits.
in press

- Favera, R.D., Gelmann, E.P., Gallo, R.C. and Wong-Staal, F.:
A human onc gene homologous to the transforming gene
(v-sis) of simian sarcoma virus
Nature 292, 31-35 (1981)
- Frazier, W.A., Hogue-Angeletti, R.A., Sherman, R., Bradshaw,
R.A.: Topography of mouse 2,5S nerve growth factor.
Reactivity of tyrosin and tryptophane.
Biochemistry 12, 3281-3293 (1973)
- Garger, S.J., Griffith, O.M., Grill, L.K.: Rapid purification of plasmid DNA by a single centrifugation in a two-step cesium chloride-ethidium bromide gradient.
der Quellennachweis bzw. die Vorschrift ist bei BECKMAN erhältlich.
- Gellert, M., Lipsett, M.N., Davies, D.R.: Helix formation by guanylic acid.
48, 2013-2018 (1962)
- Goodman, H.: Repair of overlapping DNA termini.
in: Methods in Enzymology (Grossmann, L., Moldave, K. eds.) Acad. Press Inc. NY and London 65, 63 (1980).
- Goodman, H.M., Mc Donald, R.: Cloning of hormone genes from a mixture of cDNA molecules.
Methods in Enzymology 68, 75-90 (1979)
- Graham, Karnorsky: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubule of mouse kidney, ultrastructural cytochemistry by a new technique.
J. Histochem. Cytochem. 14, 291 (1966)
- Greene, L.A. and Shooter E.M.: The nerve growth factor: biochemistry, synthesis, and mechanism of action.
Ann. Rev. Neurosci. 3, 353-402 (1980)
- Greene, L.A., Shooter, E.M., Varon, S.: Enzymatic activities of the mouse nerve growth factor and its subunits
Proc. Natl. Acad. Sci. 60, 1383-1388 (1968)
- Greisow, M.J.: Polypeptide secondary structure may detect the specificity of prohormone conversion.
FEBS Lett. 87, 111-114 (1978)
- Grunstein, M. und Wallis J.: Colony hybridization.
Meth. Enzymol. 68, 379-389 (1979)
- Gubler, U., Hoffman, B.J.: A simple and very efficient method for generating cDNA libraries.
Gene 25, 263-269 (1983)
- Guenther, J., Nick, H.P., Monard, D.: A glia-derived neurite-promoting factor with protease inhibitory activity. EMBO J. 4, in press
- Hanahan, D.: Studies on transformation of E.coli with plas-

mids.

J. Mol. Biol. 166, 557-580 (1983)

Harper, G.P., Barde, Y.-A., Burnstock, G., Carstairs, J.R., Dennison, M.E., Suda, K. and Vernon, C.A.: Guinea pig prostate is a rich source of nerve growth factor.

Nature 279, 160-162 (1979)

Harper, G.P., Barde, Y.-A., Edgar, D., Ganten, D., Hefti, F., Heumann, R., Naujoks, K.W., Rohrer, H., Turner, J.E., Thoenen, H.: Biological and immunological properties of the nerve growth factor from bovine seminal plasma: Comparison with the properties of mouse nerve growth factor.

Neuroscience 8, 375-387 (1983)

Harper, G.P., Glanville, R.W., Thoenen, H.: The purification of the nerve growth factor from bovine seminal plasma.

J. Biol. Chem. 257, 8541-8548 (1982)

Harper, G.P. and Thoenen H.: The distribution of nerve growth factor in the male sex organs of mammals.

J. Neurochem. 34, 893-903 (1980)

Harper, G.P., Thoenen, H.: Target cells, biological effects, and mechanism of action of nerve growth factor and its antibodies.

Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 21, 205-229 (1981)

Harris-Warrick, R.M., Shooter, E.M.: 7S nerve growth factor does not bind to NGF receptors on embryonic chick sensory neurons.

Neuroscience 4, 514 (1978)

Harrison, R.G.

J. Exp. Zool. 9, 787 (1910)

Hayashi, K.: A cloning vehicle suitable for strand separation.

Gene 11, 109 (1980)

Heidecker, G. and Messing, J.: Sequence analysis of zein cDNAs obtained by an efficient mRNA cloning method.

Nucleic Acids Res. 11, 4891-4906 (1983)

Herrup, K. and Shooter E.M.: Properties of β nerve growth factor receptor of avian dorsal root ganglia.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 3884-3888 (1973)

Heumann, R., Schwab, M., Thoenen, H.: A second messenger required for nerve growth factor biological activity?

Nature 292, 838-840 (1981)

Heumann, R., Schwab, M., Merkl, R., Thoenen, H.: Nerve growth factor mediated induction of choline acetyltransferase in PC12 cells; evaluation of the site of action of nerve growth factor and the involvement of lysosomal degradation products of nerve growth factor.

- J. Neurosci. 4, 3039-3050 (1984)
- Hill, C.E. und Burnstock, G.: Amphibian sympathetic ganglia in tissue culture
Cell Tissue Res. 162, 209-232 (1975)
- Hirata, Y. and Orth, D.N.: Secretion of epidermal growth factor, nerve growth factor, and renin-like enzymes by dispersed male mouse submandibular gland cells in vitro.
Endocrinology 107, 92-97 (1980)
- Hoare, D.G. and Koshland, D.E.: A method for the quantitative modification and estimation of carboxylic acids in proteins.
J. Biol. Chem. 242, 2447-2453 (1967)
- Hogue-Angeletti, R., Bradshaw, R.A.: Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: amino acid sequence.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 2417-2420 (1971)
- Hogue-Angeletti, R., Frazier, W.A., Jacobs, J.W., Niall, H.D., Bradshaw, R.A.: Purification, characterization and partial amino acid sequence of nerve growth factor.
Biochemistry 15, 26-34 (1976)
- Hogue-Angeletti, R., Mercanti, D., Bradshaw, R.A.: Amino acid sequence of mouse 2.5S nerve growth factor. I. Isolation and characterization of the soluble tryptic and chymotryptic peptides.
Biochemistry 12, 90-100 (1973)
- Hopp, T.P. and Woods, K.R.: Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3824-3828 (1981)
- Howles, P.H., Dickinson, D.P., Di Caprio, L.L., Woodworth-Gutai, M., Gross, K.W.: Use of a cDNA recombinant for the γ -subunit of mouse nerve growth factor to localize members of this multigene family near the TAM-1 locus on chromosome 7.
Nucleic Acids Res. 12, 2791-2805 (1984)
- Humphries, P., Cochet, M., Krust, P., Gerlinger, P., Kourilsky, P., Chambon, P.: molecular cloning of extensive sequences of the in vitro synthesized chicken ovalbumin structural gene.
Nucleic Acids Res. 4, 2389-2406 (1977)
- Igarashi, K., Hashimoto, S., Miyake, A., Kashiwagi, K., Hirose, S.: Increase of fidelity of polypeptide synthesis by spermidine in eukaryotic cell-free systems.
Eur. J. Biochem. 128, 597-604 (1982)
- Isackson, P.J., Ullrich, A., Bradshaw, R.A.: Mouse 7S nerve growth factor: complete sequence of a cDNA coding for the α -subunit precursor and relationship to serine

- proteases.
Biochemistry 23, 5997-6002 (1984)
- Jacobson, M.: Cellular interaction and interdependence during development of the nervous system.
in: Developmental neurobiology NY/London: Plenum, 253-307 (1978)
- Kagan, A. and Glick, M.: Oxctoxin
in: Methods of hormone radioimmunoassay (Jaffe, B.M., Behrman, H.R. eds) Academic Press, NY 327-229 (1979)
- Kakidani, H., Furutani, Y., Takahashi, H., Noda, M., Morimoto, Y., Hirose, T., Asai, M., Inayama S., Nakanishi, S., Numa S.: Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine β -neo-endorphin/dynorphin precursor.
Nature 298, 245-249 (1982)
- Karanthanas: M13 DNA sequencing using reverse transcriptase.
focus 4, number 3, 6 (1982)
- Kato, K., Goncalves, J.M., Houts, G.E., Bollum, F.J.: Deoxy-nucleotid-polymerizing enzymes of calf thymus gland.
J. Biol. Chem. 242, 2780-2789 (1967)
- Kauzmann, W.: Some factors in the interpretation of protein denaturation.
Advan. Protein Chem. 14 1-63 (1959)
- Komoriya, A., Hortsch, M., Meyers, C. Smith, M., Kanety, H., Schlessinger, J.: Biologically active synthetic fragments of epidermal growth factor: localisation of a major receptor-binding region.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1351-1355 (1984)
- Korsching, S. und Thoenen, H.: Quantitative demonstration of the retrograde axonal transport of endogenous nerve growth factor.
Neurosci. Lett. 39, 1-4 (1983)b
- Korsching, S., Thoenen, H.: Nerve growth factor in sympathetic ganglia and corresponding target organs of the rat: Correlation with the density of sympathetic innervation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3513-1516 (1983) (a)
- Korsching, S. and Thoenen H.: Nerve growth factor supply for sensory neurons: site of origin and competition with the sympathetic nervous system
Neurosci. Lett. 54, 201-205 (1985)
- Krieg, P.A., and Melton, D.A.: Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs.
Nucleic Acids Research 12, 7057 (1984)
- Lacassagne, J.: Dimorphisme sexuel de la glande sousmaxil-

laire chez la souris.

C.R. Seances Soc. Biol. Ses Fil 133, 180-181 (1940)

Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature (London) New Biol. 227, 680-685 (1970)

Land, H.M., Grez, H., Hansen, H., Lindermaier, W., Schuetz, G.: 5' terminal sequences of eukaryotic mRNA can be cloned with high efficiency.

Nucleic Acids Res. 9, 2251 (1981)

Langley, K.E., Villareja, M.R., Fowler, A.V., Zamenhof, P.J. Zabin, J.: Molecular basis of β -galactosidase α -complementation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1254-1257 (1975)

Langone, J.: ¹²⁵I-labeled protein A: Reactivity with IgG and use as a tracer in radioimmunoassay.

Meth. Enzymol. 70, 356 (1980)

Legocki, R.P. and Verma D.P.S.: Multiple immunoreplica technique: screening for specific proteins with a series of different antibodies using one polyacrylamide gel.

Anal. Biochem. 111, 385-392 (1981)

Lerner, A.R., Green, N., Alexander, H., Lin, F.T., Sutcliffe, G., Shinnick, T.M.: Chemically synthesized peptides predicted from the nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome elicit antibodies reactive with the native envelope protein of Dane particles.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3403-3407 (1981)

Levi-Montalcini, R.

in: The chemical basis of development (Mc Elroy, W.D. and Glass, B. eds.) Johns Hopkins Press Baltimore, Maryland 646-664 (1958)

Levi-Montalcini, R., Aloe, L., Mugnaini, E., Oesch, F., Thoenen, H.: Nerve growth factor induces volume increase and enhances tyrosine hydroxylase synthesis in chemically axotomized sympathetic ganglia of newborn rats.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 595-599 (1975)

Levi-Montalcini, R., Angeletti, P.U.: Hormonal control of the nerve growth factor content in the submaxillary glands of mice.

in: Salivary glands and their secretion New York: Pergamon 129-141 (1964)

Levi-Montalcini, R. and Angeletti, P.U.: Biological aspects of the nerve growth factor.

in: Ciba foundation symposium. Growth of nervous system; G.E.W. (Wolstenholme and O'Connor, M. eds.) Churchill, London 126-147 (1968)

Levi-Montalcini, R. und Hamburger, V.: Selective growth

- stimulating effects of mouse sarcoma of the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. J. Exp. Zool. 116, 321-361 (1951)
- Levi-Montalcini, R.
Ann. NY Acad. Sci. 55, 330 (1952)
- Lomedico, P., Rosenthal, N., Efstratiadis, A., Gilbert, W., Kolodner, R., Tizard, R.: The structure and evolution of two nonallelic rat preproinsulin genes. Cell 18, 545-558 (1979)
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)
- Luka, J., Sternas, L., Jörnvall H., Klein, G. Lerner, R.: Antibodies of predetermined specificity for the NH₂-terminus of a cellular protein p53 react with the native molecule. Evidence for the presence of different p53s. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1199-1203 (1983)
- Maat, J. and Smith, A.J.H.: A method for sequencing restriction fragments with dideoxynucleoside triphosphates. Nucleic Acids Res. 5, 4537 (1978)
- Maccacchini, M., Rubin, Y., Blobel, G., Schatz, G.: Import of proteins into mitochondria: precursor forms of the extramitochondrially made F₁-ATPase subunits in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 343-347 (1979)
- Mac Donald, R.J., Przybyla, A.E. and Rutter, W.J.: Isolation and in vitro translation of messenger RNA coding for pancreatic amylase. J. Biol. Chem. 252, 5522 (1977)
- Mandel, M., and Higa, A.: Calcium dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol. 53, 154 (1970)
- Maniatis, T., Efstratiadis, A., Kee, S.G., Kafatos, F.C.: In vitro synthesis and molecular cloning of eukaryotic structural genes. in: Symposia on molecular and cellular biology vol.5; Molecular mechanisms in the control of gene expression, E.C.M.- U.C.L.A. (Nierlich, D.P., Rutter, W.J., Fox, C.F. eds.) Acad. Press, NY 513-533 (1976)
- Maniatis, T., Frisch, E.F.; Sambrook, J.: in: Molecular cloning, a laboratory manual CSH S.346 (1982)a
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J.: Hybridization selection using DNA bound to nitrocellulose. in: Molecular cloning, a laboratory manual CSH S.330 (1982)b
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J.

in: Molecular cloning, a laboratory manual CSH S. 223
(1982)c

- Marchalonis, J.J.: An enzymic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins.
Biochem. J. 113, 299-305 (1969)
- Mariottini, P., Chomyn, A., Attardi, G., Trovato, D., Strong D.D., Doolittle, R.F.: Antibodies against synthetic peptides reveal that the unidentified reading frame A 6L, overlapping the ATPase 6 gene, is expressed in human mitochondria.
Cell 32, 1269-1277 (1983)
- Mason, A.J., Evans B.A., Cox, D.R., Shine J., Richards, R.J.: Structure of mouse kallikrein gene family suggests a role in specific processing of biologically active peptides.
Nature 303, 300-307 (1983)
- Maxam, A.M., Gilbert, W.: A new method for sequencing DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 560-564 (1977)
- Mc Donnell, M.W., Simon, M.N., Studier, F.W.: Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels.
J. Mol. Biol. 110, 119-146 (1977)
- Meek, R.L., Walsh, K.A., Palmiter, R.D.: The signal sequence of ovalbumin is located near the NH₂ terminus.
J. Biol. Chem. 257, 12245-12251 (1982)
- Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K., Green, M.R.: Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP 6 promoter.
Nucleic Acids Res. 12, 7035-7056 (1984)
- Mercanti, D., Butler, R., Revoltella, R.: A tryptic digestion fragment of nerve growth factor with nerve growth factor promoting activity.
Biochem. Biophys. Acta 496, 412 (1977)
- Messing, J., Crea, R., Seeburg, P.: A system for shotgun DNA sequencing.
Nucleic Acids Res. 9, 309-321 (1981)
- Messing, J., Gronenborn, B., Müller-Hill, B. and Hofschneider, P.H.: Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle. Insertion of a Hinc II fragment of the lac regulatory region in M 13 replicative form in vitro.
Proc. Natl. acad. Sci. USA 74, 3642-3646 (1977)
- Meyer, D.J., Krause, E. Dobberstein, B.: Secretory protein translocation across membranes - the role of the "docking" protein.

Nature 297, 647-650 (1982)

Michelson, A.M., Orkin, S.H.: Characterization of homopolymer tailing reaction catalysed by terminal deoxynucleotidyl transferase.

J. Biol. Chem. 257, 14773-14782 (1982)

Mizuno, K., Matsuo, H.: A novel protease from yeast with specificity towards paired basic residues.

Nature 309, 558-560 (1984)

Moore, J.B., Mobley, W.C., Shooter, E.M.: Proteolytic modification of the nerve growth factor protein

Biochemistry 13, 833 (1974)

Nichols, R. und Shooter E.: Characterization of the differential interaction of microheterogeneous forms of the γ -subunit of the 7S nerve growth factor with natural and synthetic ligands

J. Biol. Chem. 258, 10296-10303 (1983)

Noda, M., Furutani, Y., Takahashi, H., Toyosato, M., Hirose, T., Inayama, S., Nakanishi, S., Numa, S.: Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin.

Nature 295, 202-206 (1982)

Noyes, B.E., Mevarech, M., Stein, R., Agarwal, K.L.: Detection and partial sequence analysis of gastrin mRNA by using an oligodeoxynucleotide probe.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1770-1774 (1979)

O'Farrell, P.H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.

J. Biol. Chem. 250, 4007-4021 (1975)

O'Farrell, P.Z., Goodman, H.M., O'Farrell, P.H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins.

Cell 12, 1133-1142 (1977)

O'Sullivan, M.J., Gueggi, E., Morris, D., Chieragatti, G., Simmonds, A.D., Simmons, M., Bridges, J.W., Marks, V.: Comparison of two methods of preparing enzyme-antibody conjugates: application of these conjugates for enzyme immunoassay.

Analyt. Biochem. 100, 100-108 (1979)

Oger, J., Arnason, B.G., Pantazias, N., Leirich, J., Young, M.: Synthesis of nerve growth factor by L and 3T3 cells in culture.

Proc. Natl. Acad. Sci. 71, 1554-1558 (1974)

Okayama, H., Berg, P.: High efficiency cloning of full length cDNA.

Mol. Cell Biol. 2, 161 (1982)

Paff, E., Mussgay, M., Böhm, H.O., Schulz, G.E., Schaller,

H.: Antibodies against a preselected peptide recognize and neutralize foot and mouth disease virus.
EMBO J. 1, 869-874 (1982)

Tainer, J.A., Getzoff, E.D., Alexander, H., Houghten, R.A., Olson, A.J., Lerner R.A.: The reactivity of anti-peptide antibodies is a function of the atomic mobility of sites in a protein.
Nature 312, 127-134 (1984)

Pantazis, N.: Nerve growth factor synthesized by mouse fibroblast cells in culture: absence of α and γ subunits.
Biochemistry 22, 4264-4271 (1983)

Parnes, J.R., Velan, B., Felsenfeld, A., Ramanathan, L., Ferrini, U., Appella, E., Sidman, J.G.: Mouse α_2 microglobulin cDNA clones: a screening procedure for cDNA clones corresponding to rare mRNAs.
Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 2253 (1981)

Pattison, S.E., Dunn, M.F.: On the relationship of zinc ions to the structure and function of the 7S nerve growth factor protein.
Biochemistry 14, 2733 (1975)

Payvar, F. and Schimke, R.T.: Methylmercury hydroxide enhancement of translation and transcription of ovalbumin and conalbumin mRNAs.
J. Biol. Chem. 254, 7636-7642 (1979)

Peacock, L.S., Mc Iver, Monahan, J.J.: Transformation of E.coli using homopolymer-linked plasmids chimeras.
Biochem. Biophys. Acta 655, 243-250 (1981)

Pelham, H.R.B., Jackson, R.J.: An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates.
Eur. J. Biochem. 67, 247-256 (1976)

Perez-Polo, J.R., Bamberg, J.R., De Jong, W.W.W., Straus, D., Baker, M., Shooter, E.M.
in: Nerve growth factor and its antiserum. (Zaimis E. and Knight J., eds.) Athlone Press London, S.19 (1972)

Pullen, R.A., Lindsay, D.G., Woods, S.P., Tickle, I.J., Blundell, T.L., Wollmer, A.; Krail, G., Brandenburg, D.; Zahn, H. Gliemann, J., Gammeltoft, S.: Receptor-binding region of insulin.
Nature 259, 369-373 (1976)

Raymond, J., and Shore, G.C.: The precursors for carbamyl phosphate synthetase is transported to mitochondria via a cytosolic route
J. Biol. Chem. 254, 9335 (1979)

Retzel, E.F., Collet, M.S. and Faras A.J.: Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid by the avian retrovirus reverse transcriptase in vitro: optimum conditions

- required for transcription of large ribonucleic acid templates.
Biochemistry 19, 513 (1980)
- Reyes, A.A., Wallace R.B.: Use of synthetic oligonucleotide hybridization probes for the characterization and isolation of cloned DNAs.
in: Genetic engineering principles and methods vol. 6 (Setlow, J.K., Hollaender, A.) Plenum Press NY and London, 157-173 (1984)
- Ricciardi, R., Miller, J.S., Roberts, B.E.: Purification and mapping of specific mRNAs by hybridization-selection and cell-free translation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4927-4931 (1979)
- Rigby, P.W., Dieckmann, M., Rhodes, C., Berg, P.: Labelling deoxynucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I.
J. Mol. Biol. 113, 237-251 (1977)
- Rohrer, H. and Barde, Y.-A.: Presence and disappearance of nerve growth factor receptors on sensory neurons in culture.
Dev. Biol. 89, 309-315 (1982)
- Ronne, H., Lundgren, S., Severinsson, L., Rask, L. and Peterson, P.A.: Growth factor-binding proteases in the murine submaxillary gland: isolation of a cDNA clone.
EMBO J. 2, 1561-1564 (1983)
- Rougeon, F., Kourilsky, P., Mach, B.: Insertion of a rabbit α -globin gene sequence into an E.coli plasmid.
Nucleic Acids Res. 2, 2365 (1975)
- Rubin, S.J., Bradshaw, R.A.: Isolation and partial amino acid sequence analysis of nerve growth factor from the guinea pig prostate.
J. Neurosci. Res. 6, 451-464 (1981)
- Sachs, D.H., Schechter, A.N., Eastlake, A., Anfinsen, C.B.: An immunologic approach to the conformational equilibria of polypeptides.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 3790-3794 (1972)
- Sanger, F. and Coulson, A.R.: The use of the acrylamide gels for DNA sequencing.
Febs Lett. 87, 107-110 (1978)
- Scheele, G., Dobberstein, B., Blobel, G.: Transfer of proteins across membranes.
Eur. J. Biochem. 82, 593-599 (1978)
- Schwab, M., Stöckel, K. and Thoenen, H.: Immunocytochemical localization of nerve growth factor (NGF) in the submandibular gland of adult mice by light and electron microscopy.
Cell Tissue Res. 169, 289-299 (1976)

- Schwab, M., Thoenen, H.: Retrograd axonal transport.
in: Handbook of neurochemistry V (Lajtha, A., ed.)
Plenum Press, NY, 381-404 (1983)
- Scott, J., Selby, M., Urdea, M., Quiroga, M., Bell, G.J.,
Rutter, W.: Isolation and nucleotid sequence of a
cDNA encoding the precursor of mouse nerve growth
factor.
Nature 302, 538-540 (1983)
- Scott J., Urdea M., Quiroga M., Sanchez-Pescador R., Fong
N., Selby M., Rutter W.J., Bell G.: Structure of a
mouse submaxillary messenger RNA encoding epidermal
growth factor and seven related proteins.
- Seeds, B.: diazotizable acrylamine cellulose papers for the
coupling and hybridization of nucleic acids.
Nucleic Acids Res. 10, 1799 (1982)
- Server, A.C., Herrup, K., Shooter, E.M., Angeletti, R.H.,
Frazier, W.A., Bradshaw, R.A.: Comparison of the nerve
growth factor proteins from cobra venom (Naja naja)
and mouse submaxillary gland.
Biochemistry 15, 35-39 (1976)
- Server, A.C., Shooter, E.M.: Nerve growth factor
Adv. Protein Chem. 31, 339-409
- Shenk, T.E., Rhodes, C., Rigby, P.W.J., Berg, P.: Biochemi-
cal method for mapping mutational alternations in DNA
with S1 nuclease: the location of deletions and tempe-
rature sensitive mutations in Simian virus 40.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 989-993 (1975)
- Shore, G.C. and Tata, J.R.: Two fractions of rough endoplas-
mic reticulum from rat liver.
J. Cell Biol. 72, 726-743 (1977)
- Smith, A.J.H.: The use of exonuclease III for preparing
single stranded DNA for use as a template in the chain
termination sequencing method.
Nucleic Acids Res. 6, 831 (1979)
- Smith, M.: Synthetic oligodeoxynucleotides as probes for
nucleic acids and as primers in sequence determina-
tion.
in: Methods of DNA and RNA sequencing (Sherman, M.,
Weissman, M.D. eds.) chapter 2 (1983)
- Smith, H.O., Birnstiel, M.L.: A simple method for DNA re-
striction site mapping.
Nucleic Acids Res. 3, 2387-2398 (1976)
- Southern, E.M.: Detection of specific sequences among DNA
fragments separated by gel electrophoresis.
J. Mol. Biol. 98, 503-517 (1975)

- Stach, R.W., Shooter, E.M.: The biological activity of cross-linked β -NGF protein.
J. Biol. Chem. 249, 6668-6674 (1974)
- Stach, R.W., Wagner, B.J., Stach, B.M.: A more rapid method for the isolation of the 7S nerve growth factor complex.
Anal. Biochem. 83, 26-32
- Steiner: Peptide hormone precursors: biosynthesis, processing and significance.
in: Peptide hormones (Parson, J.A. ed.) University Park Press London, 49-64 (1976)
- Stoeckel, K., Schwab, M., E., Thoenen, H.: Specificity of retrograde transport of nerve growth factor (NGF) in sensory neurons: a biochemical and morphological study.
Brain Res. 89, 1-14 (1975)
- Suggs, V.S., Hirose, T., Miyake, T., Kawashima, E.H., Johnson, M., Itakura, K., Wallace, R.B.: Use of synthetic oligonucleotides for the isolation of specific cloned DNA sequences.
in: Developmental biology using purified genes. ICN-UCLA Symposia on molecular and cellular biology (Brown and Fox, D.F. eds.) New York: Academic Press, vol.23 683-693 (1981)
- Suggs, S.W., Wallace, R.B., Hirose, T., Kawashima, E., Itakura, K.: Use of oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned mRNA sequences for human β 2-microglobulin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6613-6617 (1981)
- Surolia, A., Pain, D., Khan, M.J.: Protein A: nature's universal antibody.
Tibs, 74-76 (1982)
- Swift, G.H., Dagorn, J.C., Ashley, P.L., Cumminigs, S.W. and Mac Donald R.J.: Rat pancreatic kallikrein mRNA: nucleotide sequence and aminoacid sequence of the encoded preproenzyme.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7263-7367 (1982)
- Symington, J., Green, M., Brackmann, K.: Immunoautoradiographic detection of proteins after electrophoretic transfer from gels to diazo-paper: analysis of adenovirus encoded proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 177-181 (1981)
- Tabor, H., Tabor, C.W.: Polyamine requirement for efficient translation of amber codons in vivo.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7087-7091 (1982)
- Tainer, J.A., Getzoff, E.D., Alexander, H. Houghton, R.A., Olson, A.J. und Lerner, R.A.: The reactivity of anti-peptide antibodies is a function of the atomic mobili-

- ty of sites in a protein.
Nature 312, 127-134 (1984)
- Taylor, J.M., Cohen, S., and Mitchell, W.A.: Epidermal growth factor: high and low molecular weight forms.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 164-171 (1970)
- Thoenen, H., Barde, Y.-A.: Physiology of nerve growth factor
Physiol. Rev. 60, 1284-1335 (1980)
- Thomas, P.: Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5201-5205 (1980)
- Tinoco, J., Borer, P.N., Dengler, B., Levine, M.D., Uhlenbeck, O.C., Crothers, D.M., Gralla, J.: Improved estimation of secondary structure in ribonucleic acids.
Nature New Biol. 246, 40 (1973)
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354 (1979)
- Ullrich, A., Coussen, L., Hayflick, J.S., Dull, T.J., Gray, A., Tam, A.W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T.A., Schlessinger, J., Downward, J., Mayes, E.L.V., Whittle, N., Waterfield, M.D., and Seeburg, P.H.: Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A 431 epidermoid carcinoma cells
Nature 309, 418-425 (1984)
- Ullrich, A., Gray, A., Berman, C., Dull, T.J.: Human β -nerve growth factor gene sequence highly homologous to that of mouse.
Nature 303, 821-825 (1983)
- Varon, S., Nomura, J., Shooter, E.M.: The isolation of the mouse nerve growth factor protein in a high molecular weight form
Biochemistry 6, 2202-2209 (1967)
- Varon, S., Nomura, J., Shooter, E.M.: Reversible dissociation of the mouse nerve growth factor protein into different subunits.
Biochemistry 7, 1296-1303 (1968)
- Vieira, J. and Messing, J.: the pUC plasmid, an M13 mp7 derived system for insertion, mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers.
Gene 19, 259-268 (1982)
- Walker, P., Weichsel, M.E., Morton, E.I., Guo, S.M., Fisher, D.A.: Thyroxine increases nerve growth factor concentration in adult mouse brain.
Science 204, 427-429 (1979)

- Wallace, R.B., Jokuson, M.J., Suggs, S.V., Miyoski, K., BHatt, R., Itakura, K.: A set of synthetic oligonucleotide primers for the DNA sequencing in the plasmid vector pBR 322. *Gene* 16, 21-26 (1981)
- Walter, G. and Doolittle R.: Antibodies against synthetic peptides. in: Genetic engineering vol. 5 (Setlow, J.K., Hollaender eds.) Plenum Press
- Walter, P., Blobel, G.: Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature* 299, 691-697 (1982)
- Walter, P., Blobel, G.: Preparation of microsomal membranes for cotranslational protein translocation. *Meth. Enzymol.* 96, 84-93 (1983)
- Walter, P., Gilmore, Reid, Blobel, G.: Protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Cell* 38, 5-8 (1984)
- Walter, P., Ibrahimi, I., Blobel, G.: Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. 1. Signal recognition protein (SRP) binds in-vitro-assembled polysomes, synthesizing secretory proteins. *J. Cell. Biol.* 91, 545-550 (1981)
- Walter, G., Scheidtmann, K.-H., Carbone, A., Landano, A.P., Doolittle, R.F.: Antibodies specific for the carboxy- and amino-terminal regions of simian virus 40 large tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5197-5200 (1980)
- Watanabe, Y., Igarashi, K., Hirose, S.: Differential stimulation by polyamines of phage RNA-directed synthesis of proteins. *Biochem. Biophys. Acta* 656, 134-139 (1981)
- Waxdal, M.J., Koenigsberg, W.H., Henley, W.L., Edelman, G.M.: The covalent structure of a human G immunoglobulin. II. Isolation and characterization of the cyanogen bromide fragments. *Biochem.* 7, 1959 (1968)
- Weber, L.A., Hickey, E.D., Moroney, P.A., Baglioni, C.: Inhibition of protein synthesis by Cl^- . *J. Biol. Chem.* 252, 4007-4010 (1977)
- Wickens, M.P., Buell, G.N., Schimke, R.T.: Synthesis of double-stranded DNA complementary to lysozyme, ovomucoid, and ovalbumin mRNA: optimization for full length second strand synthesis by *Escherichia coli* DNA polymerase I. *J. Biol. Chem.* 253, 2483-2495 (1978)

- Wilson, C.M., Reynolds, R.C., Ward, P.E.: Comparison of genetic and endocrine control of renin and kallikrein in mouse submandibular gland.
Life Sci. 31, 1613-1618 (1982)
- Wilson, W., Shooter, E.M.: Structural modification of the NH_2 terminus of nerve growth factor.
J. Biol. Chem. 254, 6002-6009 (1979)
- Wood, K.O., Lee, J.C.: Integration of synthetic globin genes into an E.coli plasmid.
Nucleic Acids Res. 3, 1961-1971
- Wünsch, E.: Synthese des vermuteten Nervenwachstumsfaktor-Aktivzentrums.
Monatshefte für Chemie 116, 505-524 (1985)
- Young, H.: Recovery of DNA from guanidiniumisothiocyanate-cesium chloride gradients.
focus 6, 11 (1984)
- Zain, S., Sambrook, J., Roberts, R.J., Keller, W., Fried, M., Dunn, A.R.: Nucleotide sequence analysis of the leader segments in a cloned copy of adenovirus-2 fiber mRNA.
Cell 16, 851 (1979)

Zum Schluß möchte ich Herrn Professor Dr. F. Kaudewitz und ganz besonders Herrn Professor Dr. H. Thoenen danken, der trotz seiner Tätigkeit als Direktor des Instituts mich voller Interesse betreute und mir stets hilfreich zur Seite stand.

Mein Dank gilt ferner:

Frau Dr. S. Mathews, Herrn Dr. R. Götz und Herrn Dr. L. DeGennaro für ihre wertvollen Hinweise bei experimentellen Problemen.

Herrn Dr. R. Heumann für die Bestimmung der Transkriptlänge von bNGF.

Frau Reitmayer für die Durchführung der Enzymimmuntests.

Frau Springorum, Leiterin der Fotostelle, Frau Bauereiss, der techn. Zeichnerin, Frau Eichler für ihre Hilfestellung bei der Textverarbeitung und Herrn Wittenzeller, Chef der Zentralwerkstatt, mit seinen Mitarbeitern.

einer Vielzahl von Fachkollegen des Max-Planck-Instituts für Biochemie für ihre Hilfsbereitschaft und ihre Anregungen.

meinen Eltern, die diese langwierige Ausbildung in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Lebenslauf

- 1953 geboren am 12.10.53 in München
- 1959-1964 Volksschule
- 1964-1973 Gisela-Gymnasium in München
- 1973 Abitur
- 1973-1974 Veterinärmedizin an der Universität München
- 1974-1975 Studium der Biologie in Ulm
- 1975-1980 Fortsetzung des Biologiestudiums in München mit der Fächerkombination: Tierphysiologie-molekulare Genetik-Biochemie
- 1980-1981 Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Genetik in München über Porphyrinbiosynthese bei Hefe
- 1982-1985 Dissertation bei Prof.Thönen, MPI f. Psychiatrie in Martinsried. Empfänger eines Doktorandenstipendiums der MPI-Gesellschaft und eines Stipendiums des Bundesministeriums für Forschung u. Technologie
- 1985 Forschungstätigkeit am Friedrich Miescher-Institut in Basel

